

ANTIGÈNES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

CONTEXTE DE L'INVENTION

5 a) Domaine de l'invention

La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme.

b) Brève description de l'art antérieur

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Malgré le fait que l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA, il n'existe pas encore de vaccin efficace contre cette maladie.

Des études précédentes ont conduit à la mise en évidence de polypeptides antigéniques du stade pré-érythrocytaire de la maladie, notamment les polypeptides SALSA (pour Sporozoïte Liver Stage Antigen) décrits dans EP A-0407230, le LSA 1 (pour Liver Stage Antigen) décrit dans WO 92/13884 et LSA-3 décrit dans FR 2,735,478.

La présente invention est relative à de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques des stades pré-érythrocytaires et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION

30 La Demanderesse a identifié une série de 120 fragments d'ADN génomique codant pour des protéines exprimées aux stades pré-érythrocytaires, c'est-à-dire au stade sporozoïte et/ou au stade hépatique. La caractérisation

initiale de cette série de clones a conduit à identifier l'antigène LSA-1, puis SALSA, puis STARP, puis LSA-3. Des travaux plus récents portant sur 10 fragments de la même banque de clones codant pour des stades pré-érythrocytaires a permis de fournir des précisions concernant 8 d'entre eux, 3 se 5 sont avérés être des gènes déjà connus comme étant exprimés au stade érythrocytaire et les 5 autres comme des gènes nouveaux non décrits à ce jour, et dont l'expression aux stades pré-érythrocytaires a pu être confirmée.

Par ailleurs, les travaux réalisés en utilisant les cellules de volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, celles de chimpanzés protégés par la même 10 méthode et celles de chimpanzés comme d'Aotus trivirgatus, protégés par immunisation par l'antigène LSA-3 ont conduit à caractériser les réponses cellulaires à fort taux de sécrétion d'interféron- γ , généralement associés avec une faible production d'anticorps, comme étant associées avec l'état de protection, et vice-versa.

15 Parmi les nouveaux gènes pré-érythrocytaires étudiés, deux d'entre eux, dénommés DG747 et DG772 possèdent plusieurs propriétés remarquables: ils génèrent des réponses cellulaires à taux élevé d'Interféron- γ , détectées par ELISPOT chez des volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, qui sont retrouvés également pour plusieurs régions de l'antigène LSA-3 mais qui sont 20 absentes pour 4 régions de l'antigène LSA-1, deux de SALSA, deux de STARP et deux de la "CircumSporozoïte protein". Ces deux mêmes clones sont positifs également dans les mêmes tests chez les chimpanzés protégés par des sporozoïtes irradiés. Le profil de réponse différentielle entre les chimpanzés protégés et celles de chimpanzés ayant reçu des sporozoïtes irradiés à trop forte 25 dose, et non protégés, est identique à celui enregistré avec la molécule LSA-3 qui est capable d'induire une protection. Ce profil de réponse correspond, d'après les travaux réalisés chez le rongeur, à la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. La séquence complète des deux gènes a été identifiée. Les protéines correspondantes ont une antigénicité élevée 30 chez les individus exposés au parasite en zone d'endémie (réaction chez 80% des adultes de zone d'endémie). Leur localisation en surface du sporozoïte et leur production au cours de la maturation intra-hépatique du parasite a été

confirmée par diverses méthodes biologiques. Leur immunogénicité chez l'animal sous forme de protéines recombinantes, ou sous forme de plasmides (immunisation génétique) a été démontrée.

Plus particulièrement, un des aspects de la présente invention concerne 5 un polynucléotide isolé ou purifié comprenant une séquence nucléotidique ayant au moins 60%, préféablement au moins 80% et plus préféablement au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO: 1 (DG747) ou la SEQ ID NO: 2 (DG772).

Un autre aspect de la présente invention concerne un polynucléotide isolé ou purifié comprenant au moins 10 nucléotides consécutifs identiques à la SEQ 10 ID NO: 1 ou la SEQ ID NO: 2. L'invention vise également les polynucléotides isolés ou purifiés qui s'hybrident dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide tel que défini précédemment.

Un autre des aspects de la présente invention concerne un polypeptide isolé ou purifié qui est codé par un polynucléotide tel que défini précédemment. 15 Dans un mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention présente au moins 60%, préféablement au moins 80% et plus préféablement au moins 95% d'homologie avec la SEQ ID NO: 3 (DG747) ou la SEQ ID NO: 4 (DG772). Selon un autre mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention comprend au moins 5 acides aminés consécutifs identiques à l'une des SEQ ID NOs: 3 à 8. 20 Encore dans un autre mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention présente au moins 40%, préféablement au moins 60%, plus préféablement au moins 80% et encore plus préféablement au moins 95% d'identité avec l'une des SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12. L'invention couvre également les polypeptides recombinants ou chimériques comprenant au moins un polypeptide tel que défini 25 précédemment.

Un autre des aspects de la présente invention concerne un antigène isolé ou purifié consistant en un polynucléotide ou en un polypeptide tels que définis précédemment.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un conjugué 30 antigénique constitué d'un polynucléotide et/ou d'un polypeptide tels que définis précédemment; et d'un support sur lequel lesdits polynucléotides/polypeptides sont adsorbés. Un tel conjugué peut avantageusement être utilisé pour

l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.

Un autre des aspects de la présente invention concerne des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, préféablement humanisés, reconnaissants spécifiquement au moins un des polynucléotides, polypeptides et/ou conjugués définis précédemment. Un aspect connexe de la présente invention concerne les compositions pharmaceutiques qui comprennent à titre de substance active un ou plusieurs de ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un vecteur de clonage ou d'expression (tel que les plasmides, les cosmides et les phages) comprenant une séquence polynucléotidique selon la présente invention. L'invention couvre également les cellules hôtes comprenant un tel vecteur, et tout particulièrement les cellules *E.Coli* recombinantes déposées à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accésion I-2671 et I-2672.

Un autre des aspects de la présente invention concerne une composition immunogène comprenant des polynucléotides, des polypeptides et/ou des conjugués tels définis précédemment; et un véhicule pharmaceutique acceptable.

Un autre aspect connexe de la présente invention concerne un vaccin anti-palustre comprenant des polynucléotides, des polypeptides et/ou des conjugués tels définis précédemment; et un véhicule pharmaceutique acceptable. Préféablement, les compositions et vaccins de la présente invention sont utilisées pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et/ou au traitement du paludisme.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne des méthodes et des kits (trousses) de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum*. Selon un mode de réalisation privilégié, la méthode comprend les étapes suivantes:

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un

anticorps tels que définis précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns; et

- b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

Selon un autre mode de réalisation privilégié, la méthode de diagnostic

5 comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec des polynucléotides, des polypeptides, et/ou des tels que définis précédemment, afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins un desdits éléments et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et
- b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

Selon un mode de réalisation privilégié, le kit de l'invention pour le

10 diagnostic *in vitro* du paludisme comprend les éléments suivants:

- a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les polynucléotides, les polypeptides, et les conjugués tels que définis précédemment;
- b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des éléments définis en (a); et
- c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

20 Selon un autre mode de réalisation privilégié, le kit de l'invention comprend les éléments suivants :

- des anticorps tels que définis précédemment;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également

porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

Un des avantages majeur de la présente invention est qu'elle fournit de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques des stades pré-érythrocytaires du paludisme. Les molécules polynucléotidiques et polypeptidiques de l'invention possèdent plusieurs propriétés remarquables. Ils génèrent notamment des réponses cellulaires à taux élevé d'interféron-γ. Les résultats obtenus suggèrent également que les molécules polynucléotidiques et polypeptidiques de l'invention ont la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. L'invention fournit également des vaccins anti-palustre efficaces et des méthodes de diagnostics sensibles du paludisme.

De nombreux autres objectifs et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description non limitative de l'invention qui suit.

15

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

Les Figures 1A, 1B, 1C et 1D montrent la liste des séquences nucléotidiques (SEQ ID NOs: 1 et 2) et en acides aminé (SEQ ID NOs: 3 et 4) de DG747 et DG772.

La Figure 1E montre des séquences répétées dégénérées caractéristiques du clone DG747 (SEQ ID NOs: 5-8).

La Figure 2A montre la séquence du gène codant pour DG747 (SEQ ID NOs: 9 et 10) extrait de la base des données génome de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum* (Gène PfB00155). En gris (■), la séquence correspondant au clone DG747. La différence avec la séquence issue de la souche T9.96 (positions 344, 357) est montrée en gras dans la séquence.

La Figure 2B montre la séquence du gène codant pour DG772 (SEQ ID NOs: 9 et 10) extrait de la base des données génome de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum*. En gris (■), la séquence correspondant au clone DG772. La différence avec la séquence issue de la souche T9.96 (position 3612) est montrée en gras dans la séquence.

Les Figures 3.1(a) et 3.1(b) sont des représentations schématiques des protéines correspondantes au DG747 (a) et DG772 (b). Les flèches fines

indiquent la localisation des amorces utilisées pour l'étude de la conservation des fragments. Les flèches vides indiquent les amorces utilisées dans la réaction RT-PCR. 3.1(a): la partie hachurée indique la région répétitive. 3.1(b): les deux régions consensus 5' cys et 3' cys sont indiquées sur le gène. La partie en pointillés représente les régions transmembranaires et non-transcrites supposées.

Les Figures 3.2A, 3.2B, 3.2C et 3.2D montrent des IFATs des stades sporozoïtes et sanguins de *P. falciparum* et des sporozoïtes de *P. yoelii* avec les anticorps anti-DG747 ou anti-DG772. Fig. 3.2A, Fig. 3.2B: sporozoïte de *P. falciparum* (A) ou *P. yoelii* (B) marqué au anti-747 ou anti-772; Fig. 3.2C, Fig. 3.2D: stade sanguin asynchrone marqué au anti-747 (C) ou au anti-772 (D); a, t, s: formes anneaux, trophozoïtes ou schizontes, respectivement.

Les Figures 3.3(a) et 3.3(b) montrent des Western blots de *P. falciparum*, *P. yoelii* et de *P. berghei* utilisant des anticorps anti-His₆-747 (a) et anti-His₆-772 (b). Ligne 1: *P. falciparum* sporozoïtes; Ligne 2: *P. falciparum* stade sanguin formes anneaux; Ligne 3: *P. falciparum* stade sanguin formes schizontes; Ligne 4: surnageant de culture asynchrone; Ligne 5: Globules rouges humains; Ligne 6: *P. yoelii* sporozoïtes; Ligne 7: *P. yoelii* stade sanguin; Ligne 8: *P. berghei* stade sanguin; 9: Globules rouges de souris.

Les Figures 3.4(a), 3.4(b) et 3.4(c) montrent sous forme de photographies des résultats de PCR d'ADN de 12 souches différentes avec des amorces spécifiques de DG747 3.4(a) et DG772 3.4(b). Le contrôle, 3.4(c), est un gène constitutif, le PCNA [Kilbey, 1993 #519]. Les ADN utilisés sont issus des souches : NF54, B1, F32, D7, D25, D28, D41, D50, D51, H1, L1, Mad20, T9.96, PA (puits 1 à 14, de gauche à droite). Le puits 15 ne contient pas d'ADN. La taille du produit PCR, correspondant à celle attendue est indiquée à côté des flèches.

Les Figures 3.5(a) et 3.5(b) illustrent à l'aide de graphiques la prévalence des réponses humorales contre His₆-747 (a) et His₆-772 (b) dans deux groupes d'âge et dans deux zones d'endémie différente.

Les Figures 3.6(a) et 3.6(b) illustrent à l'aide de graphiques les réponses cellulaires contre His₆-747 et His₆-772 chez des humains et des chimpanzés immunisés avec des sporozoïtes irradiés. Fig. 3.6a: Détection par Elispot de la

sécrétion d'IFN- γ de cellules provenant d'humains immunisés par des sporozoïtes irradiés; Fig. 3.6b: réponses cellulaires des chimpanzés immunisés par des sporozoïtes irradiés, détectés par stimulation de prolifération de lymphocytes T et sécrétion d'IFN- γ (par dosage et Elispots). I.S.: Index de stimulation; UI: Unités Internationales; LC: Leucocytes (cellules mononucléées du sang périphérique). His₆-729, PC-pGEX: Recombinants appartenant à la protéine LSA3; pGEX: protéine GST. Les valeurs seuils sont indiquées par une droite horizontale sur le graphe.

Les Figures 3.7(a) et 3.7(b) illustrent à l'aide de graphiques la distribution des isotypes d'IgG dans les réponses humorales contre His₆-747 et His₆-772 d'individus exposés différemment au paludisme. ISS: Volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés; SHI: Sérum hyper-immun; Transfusion: Sérum de personnes ayant contracté un paludisme par transfusion de sang infecté. Les taux de réponses détectés en ELISA sont représentés par rapport aux taux d'IgG total obtenus. L'écart type est indiqué sur le graphique.

Les Figures 3.8(a) et 3.8(b) illustrent à l'aide de graphiques les réponses humorales de souris immunisées avec quatre formulations de protéines recombinantes. Fig. 3.8a: réponses anti-747; Fig. 3.8b: réponses anti-772; SB: avec l'adjuvant SBS2A; micro: recombinant adsorbé sur des microparticules; IFA: Adjuvant incomplet de Freund; Vi: Sous forme d'ADN dans le vecteur VR1020 en PBS.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

L'originalité de la présente invention porte sur la mise en évidence de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire du paludisme et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostique de la maladie.

Plus particulièrement, l'invention vise des polynucléotides ayant une séquence nucléotidique d'au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou 200 nucléotides consécutifs et ayant au moins 60%, 65%, 70%, 75% préféablement 80%, 85%, 90% et plus préféablement au moins 95%, 97% ou même 100% d'identité avec la SEQ. ID NO: 1 ou NO 2. D'autres molécules selon l'invention

s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec les séquences nucléotidiques ci-dessus, et plus particulièrement avec les SEQ. ID NOs: 1 et/ou NO 2. À titre d'exemple non-limitatif de conditions de fortes stringences l'on retrouve la méthode suivante:

- 5 a) pré-hybridation et hybridation à 68°C dans une solution contenant: 5X SSPE (1X SSPE = 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄); 5X solution de Denhardt; 0.05% (w/v) dodecyl sulfate de sodium (SDS); et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon;
- 10 b) deux lavages à température ambiante pendant 10 min en présence de 2X SSPE et de 0.1% SDS;
- 15 c) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 1X SSPE et 0.1% SDS; et
- 20 d) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 0.1X SSPE et 0.1% SDS.

15 L'invention vise aussi les polypeptides (et les fragments de ceux-ci) qui dérivent des séquences nucléotidiques ci-dessus mentionnés et préférablement les polypeptides ayant au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou 200 acides aminés consécutifs et au moins 60%, 70%, 80%, 85% et plus préférablement au moins 90%, 95%, 97% ou même 100% d'homologie avec l'une des séquences 20 choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12. D'autres molécules selon l'invention contiennent au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou même 200 acides aminés consécutifs présentant au moins 60%, 70%, 80%, 85% et plus préférablement au moins 90%, 95%, 97% ou même 100% d'identité avec les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12.

25 Il est bien connu dans le domaine comment déterminer les pourcentages d'homologie et d'identité entre différentes séquences. À titre d'exemple, une méthode d'analyse d'alignement de séquences nucléotidiques et peptidiques selon l'invention est avantageusement le programme GAP GCG™ (Genetic Computer Group) du manuel de programmation UNIX™ (Wisconsin Sequence 30 Analysis Package™), algorithme de Needleman et Wunsch. Les paramètres utilisés sont les paramètres par défaut ou les paramètres suivants: pour une comparaison de séquences de nucléotides: "gap penalty" = 50; "gap extension

penalty": 3; et pour une comparaison de séquences d'acides aminés: "gap penalty" = 5; "gap extension penalty": 0.30.

Les peptides selon la présente invention peuvent être préparés par tout procédé approprié. Ils peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique mais il est également possible de les obtenir par voie biologique en utilisant notamment différents vecteurs dans les cultures cellulaires appropriées tel que cela sera décrit ci-après.

Les molécules de l'invention peuvent être utilisées telles quelles ou être modifiées (conjugués chimiques, protéine de fusion) si nécessaire. Par exemple, on peut envisager des modifications (chimiques ou nucléotidiques ou peptidiques) permettant aux nucléotides/peptides de franchir certaines barrières biologiques, de montrer une meilleure solubilisation, de faciliter leur incorporation dans des formes galéniques particulières comme par exemple des liposomes ou des microparticules. Il convient d'ailleurs de remarquer à ce propos que les peptides selon la présente invention peuvent se présenter sous forme déglycosylée, ou glycosylée, si cela est nécessaire. Une personne versée dans le domaine de l'invention saura obtenir différents polynucléotides/polypeptides et elle saura également déterminer quels sont, parmi les polynucléotides/polypeptides obtenus, ceux qui ont une activité biologique adéquate.

Ainsi, l'invention a aussi pour objet un procédé de préparation d'un peptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression (plasmide, cosmide, virus, etc) comprenant les séquences d'ADN codant pour les peptides de l'invention, suivi de la mise en culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du peptide dans le milieu de culture.

L'invention concerne donc également tout vecteur (de clonage et/ou d'expression) et tout hôte cellulaire (procaryote ou eucaryote) transformé par un tel vecteur, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence de nucléotides codant pour un peptide selon l'invention.

Plus particulièrement, l'invention vise les cellules *E. Coli* recombinante contenant un insert correspondant aux polynucléotides définis par les SEQ ID

NOs: 1 et 2. Plus préféablement les cellules *E. Coli* sont celles qui ont été déposée à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accession I-2671 et I-2672. Brièvement, ces cellules ont été obtenues par transformation d'un plasmide contenant soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la SEQ ID NO: 1, soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la SEQ ID NO:2. dans la souche *E. Coli* Dh5 α . Chacun des plasmides a été obtenus à partir d'un phage λ gt11 recombinant contenant l'insert. Une PCR a été effectuée avec des amorces flanquantes à l'insert et cet insert amplifié a été digéré avec EcoR1 et sous-cloné dans le vecteur pTreHis₆ (Invitrogen) dans les sites de EcoR1.

L'utilisation de vecteurs pour l'expression de protéines et de peptides dans les cellules d'un hôte, notamment l'humain, est connue et ne sera pas décrite plus en détail. Il peut être avantageux d'utiliser des vecteurs incorporant des séquences capables d'augmenter l'immunogénicité des polynucléotides/polypeptides de la présente invention, telles que les séquences CPG, le gène du GMCSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou des gènes des cytokines. Les constructions spécifiques dépendent évidemment de l'hôte, de l'épitope et du vecteur retenu.

Les peptides de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent aussi être utilisés pour préparer des anticorps polyclonal ou monoclonal capables de se fixer (préférablement de manière spécifique) sur au moins un peptide/polynucléotide objet de l'invention. La présente invention vise donc également de tels anticorps purifiés qui peuvent être obtenus par des techniques très bien connues comme par exemple la technique décrite par Kolher et Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* (1975), 262:495-497).

Dans un mode de réalisation privilégié de l'invention, au moins une portion des peptides immunogéniques/polynucléotides selon l'invention est conjuguée à un support sur lequel elle est absorbée ou fixée de façon covalente ou non-covalente à son extrémité C et/ou N-terminale. Le support peut être constitué de molécules porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques. Ces molécules porteuses peuvent permettre

notamment d'augmenter l'immunogénicité des peptides de l'invention par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. À titre d'exemple de molécules porteuses, on mentionnera des protéines naturelles telles que l'anatoxine tétanique, 5 l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocyanines, le PPD (purified protein derivative) de la tuberculine, etc. À titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine). À titre de supports hydrocarbonés ou lipidiques, on mentionnera les acides gras saturés ou insaturés. Le support peut également 10 prendre la forme de liposomes, de particules et microparticules, de vésicules, de microsphères de billes de latex, de polyphosphoglycans (PGLA), ou de polystyrène.

L'invention porte aussi sur des compositions vaccinales/thérapeutiques (médicament) comprenant des peptides/polynucléotides, des conjugués et/ou 15 des anticorps polyclonaux ou monoclonaux tel que décrits précédemment, et un véhicule pharmaceutique acceptable. L'invention se rapporte aussi à des compositions immunogènes capables d'induire une protection par une infection d'épreuve par Plasmodiums, aussi bien *in vivo* que *in vitro* et, de façon préférée, 20 une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*. Préféablement, les compositions selon l'invention permettent la production d'interféron-γ par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés et/ou l'obtention d'une réponse humorale IgG de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

Ces compositions peuvent être avantageuses dans le but d'être 25 administrés *in vivo* pour le traitement ou la prévention du paludisme chez l'humain. Bien entendu, l'utilisation de compositions à base d'anticorps nécessite généralement que ceux-ci soient compatibles avec l'administration à l'être humain. Il peut notamment s'agir d'anticorps humanisés par des techniques connues ou directement exprimés *in situ* à partir de la séquence d'ADN comme 30 par exemple la technique décrite dans Ren EC, Cellular and Molecular approaches to developing human monoclonal antibodies as drugs (1991), *Ann. Acad. Med. Singapore*, 20:66-70.

Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous une forme solide ou liquide quelconque habituelle pour l'administration pharmaceutique, c'est-à-dire par exemple des formes d'administration liquide, en gel, ou tout autre support permettant par exemple la libération contrôlée. Parmi 5 les compositions utilisables, on peut citer notamment les compositions injectables plus particulièrement destinées aux injections dans la circulation sanguine chez l'humain.

Les compositions de l'invention peuvent comporter également des composants augmentant ou susceptible d'augmenter l'immunogénicité des 10 peptides, notamment d'autres peptides immunogènes, des adjuvants d'immunité spécifiques ou non tels que l'alun, le QS21, l'adjuvant de Freund, l'adjuvant SBA₂, la montanide, des polysaccharides ou des composés équivalents.

La présente invention concerne de plus des compositions destinées à être administrées afin d'exprimer *in situ* les peptides décrits précédemment. Par 15 exemple, en injectant l' "ADN nu" codant pour les peptides immunogéniques de l'invention, cette injection conduit, dans un certain nombre de cas, à l'expression du peptide codée et à une réponse immunitaire contre ledit peptide. On pourra également utiliser des systèmes d'ADN nu mais comportant leur propre système d'expression ou des vecteurs d'expression tel que décrit précédemment. Les 20 vecteurs d'expression sont susceptibles, dans certains cas, d'améliorer l'activité des peptides exprimés. Les systèmes de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont connus et sont déjà largement décrits dans la littérature. Des exemples de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont décrits dans la demande internationale WO 95/111307 et dans la publication de 25 Bot *et al.* (DNA immunization of newborn mice with a plasmid expressing nucleoprotein of Influenza virus (1996), *Viral Immunol.*, 9:207-210).

L'invention porte aussi sur des méthodes de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum*.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode comprend les 30 étapes suivantes:

- a) mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un

individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un anticorps tel que décrit précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns; et

- b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode diagnostique comprend les étapes suivantes:

- a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec des molécules polynucléotidiques/polypeptidiques telles que décrites précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins une desdites molécules et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et
- b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

15 L'invention a aussi pour objet des kits (trousses) pour le diagnostique du paludisme chez un individu. Selon un mode de réalisation de l'invention, le kit comprend les éléments suivants:

- a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les molécules polynucléotidiques; les molécules polypeptidiques et les conjugués tels que décrits précédemment;
- b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des molécules définies en (a); et
- c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

25 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le kit comprend les éléments suivants:

- 30 - des anticorps tels que décrits précédemment;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à test r t au moins un desdits anticorps; et

- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué

5 Bien qu'à travers le mémoire descriptif de la présente invention on utilise le terme "peptide" et "polypeptide", il est entendu que l'invention ne se limite pas aux composés formés par l'union d'un nombre limité d'acides aminés. En effet, la souplesse des technologies recombinantes permet de réaliser des protéines comportant une pluralité d'épitopes identiques ou différents et susceptibles
10 d'améliorer l'activité immunogénique du produit final. Ainsi la présente invention couvre également les polymères immunogéniques comprenant entre deux et dix peptides choisis parmi les polypeptides définis précédemment. De même, la présente invention inclus les oligonucléotides ayant une séquence nucléotidique codant pour des oligonucléotides incorporant un ou plusieurs polynucléotides tels
15 que définis précédemment.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

EXEMPLES

20 Les exemples qui suivent servent à illustrer l'étendue d'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectués sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puissent utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la
25 présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

1) INTRODUCTION

1.1 Historique du paludisme

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites
30 protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Les efforts soutenus et le programme d'éradication entamé dans les années 50, financé par l'OMS ont

permis de limiter les zones où la maladie se propageait et de diminuer le nombre de personnes infectées. Depuis, la baisse d'efficacité des moyens de lutte contre le parasite a provoqué une augmentation des cas de paludisme par rapport à il y a 20 ans. Aujourd'hui le paludisme demeure concentré dans la ceinture subtropicale où entre 300 et 500 millions de cas cliniques sont recensés annuellement, dont au minimum 3 millions succombent en majorité à cause de l'infection par le *P. falciparum*. Suite à l'apparition et à l'extension d'une résistance globale aux seuls médicaments efficaces, et parce que les régions affectées sont en extension, l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les 10 trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA.

La description de l'infection paludéenne, dont les signes cliniques sont très caractéristiques, peut être retrouvée dans des écrits des civilisations les plus anciennes, tels que le *Nei Ching*, grand répertoire médical pour l'empereur chinois Huang Ti (2700 av. J. C.), des tablettes Mésopotamiennes (2000 av. J. C.), des papyrus Égyptiens (1500 av. J. C.) et des écrits Védiques (1500-800 av. J. C.). Une partie du « livre des épidémies » d'Hippocrate (460-370 av. J. C.) a été consacrée à la description détaillée de fièvres tertiaires ou quaternaires où est mentionnée aussi une relation entre des splénomégalies et la proximité des 20 zones marécageuses. D'ailleurs, le terme paludisme désigne une fièvre issue des zones marécageuses (L. palude = marécage), ce qui est aussi reflété par le terme de malaria (l. mall'aria) probablement introduit par Sansovino en 1560 pour décrire le « mauvais air » issu des marécages. Le drainage de ces zones a été un des seuls moyens de contrôle du paludisme connu avant la découverte de 25 l'agent infectieux. Malgré la connaissance des signes cliniques, le parasite causant la maladie n'a été découvert qu'à la fin du 19^e siècle.

En 1880 Charles Louis Alphonse Laveran a observé l'exflagellation de microgamètes et des hémратies altérées dans le sang de (Laveran, 1880), et il a associé ces formes avec la maladie. Ses conclusions ont été controversées et ne 30 furent acceptées par d'autres, en particulier par l'importante école italienne, que 5 ans plus tard. Le mode de transmission de la maladie est resté inconnu encore 12 ans. Patrick Manson avait en 1877 démontré que le n° matode de la filariose

(Elephantiasis) était transmis par un moustique. Il était convaincu que le paludisme suivait un parcours semblable. Il a conseillé à Ronald Ross d'entamer des recherches à ce sujet et ce dernier a décrit en 1897, pour la première fois, des oocystes chez des moustiques ayant été nourris sur des humains infectés.

- 5 Puis, à l'aide de *Plasmodium* d'oiseaux, il a pu décrire le cycle entier du parasite chez le moustique. Ce cycle a été confirmé, en 1898, pour les espèces plasmodiales de l'homme par les chercheurs italiens menés par Battista Grassi.

On a longtemps cru qu'après inoculation par le moustique, le sporozoïte envahissait directement le globule rouge du mammifère hôte, initiant ainsi le

- 10 cycle sanguin asexué et sexué. Un cycle exo-érythrocytaire fut décrit dès 1908 chez des plasmodes d'oiseaux par H. de Beaupaire Aragao qui démontra le développement de formes atypiques, dans des cellules endothéliales et des macrophages, capables de libérer des formes envahissant les globules rouges et de se transformer en formes typiques pigmentées du parasite. Toutefois on a cru

- 15 que le cycle tissulaire était une forme particulière de ces espèces plasmodiales. Ce n'est qu'en raison des observations faites au cours d'infections paludéennes induites et suivies étroitement chez des individus (comme la malariothérapie des années 1920-50) que la présence d'un stade supplémentaire tissulaire a été postulée puis activement recherchée. Les formes pré-érythrocytaires des

- 20 parasites de primates et d'humains n'ont été découvertes qu'en 1948 lorsque H.E. Shortt et P. C. C. Garnham ont décrit des formes hépatiques issues d'inoculations de sporozoïtes de *P. cynomolgi* (proche de *P. vivax*) chez le singe rhésus (Shortt and Garnham, 1948). En 1951, les mêmes stades ont été décrits pour *P. falciparum* (Shortt et al., 1951) dans une expérience remarquable où une

- 25 biopsie de foie a été prélevé chez un volontaire préalablement inoculé avec des millions de sporozoïtes. Toutefois les recrudescences dues à *P. vivax* ou à *P. ovale* n'étaient pas expliquées, et on a émis l'hypothèse d'un cycle exo-érythrocytaire « secondaire ». Ce n'est que beaucoup plus tard que ce phénomène fut démontré expérimentalement. Ainsi, un stade « dormant » de la 30 forme hépatique, l'hypnozoïte, a été décrit en 1980 (Krotoski et al., 1980) pour *P. cynomolgi*, l'équivalent pour le primate de *P. vivax*. Cette forme est responsable des rechutes après une longue période d'absence de parasite dans l'

sang/d'exposition aux parasites, qui sont caractéristiques de *P. vivax* et *P. ovale*. Récemment, un stade supplémentaire, le mérophore, une forme provenant des formes sanguines, a été observé dans la rate et les ganglions lymphatiques de souris infectées par les *Plasmodium* murins (*P. yoelii*, *P. chabaudi* et *P. vinckei*) 5 (Landau et al., 1999). Cette étape du cycle reste encore à être décrite dans les espèces plasmodiales humaines.

Le cycle du parasite, comme il est conçu aujourd'hui est représenté dans la figure 1 (Les parties entre parenthèse sont des formes décrites pour d'autres espèces de *Plasmodium*, mais pas pour *P. falciparum*).

10

1.2 Les moyens de lutte contre l'extension du paludisme : nécessité du développement d'un vaccin

Les deux découvertes de l'agent causal de la maladie et du vecteur de la maladie ont permis dès le début du 20^e siècle d'élaborer des moyens de défense 15 rationnels contre le paludisme en attaquant le parasite chez l'hôte vertébré par des médicaments ou en ciblant le moustique vecteur soit avec des larvicides, soit avec des insecticides, soit par l'utilisation de moustiquaires. Le succès de l'élimination de la maladie dans les zones tempérées après la 2^{ème} guerre mondiale, a mené vers une mise en place d'un programme d'éradication du 20 paludisme qui a culminé dans les années 60 où le DDT a été le principal outil contre les moustiques et la chloroquine a été la principale drogue contre le parasite. La taille des territoires endémiques ciblés a ainsi été réduite (quasi éradication dans les zones tempérées) et le nombre de personnes affectées par 25 la maladie a initialement diminué. Cependant les succès dans les zones tropicales furent de courte durée. Le nombre de malades n'a pas cessé de croître d'une part à cause de l'augmentation démographique, d'autre part en raison de l'apparition de résistances aux insecticides et aux drogues disponibles.

L'apparition de ces résistances a nécessité de s'orienter vers d'autres moyens de lutte. L'existence d'une immunité naturelle induite par l'exposition aux 30 parasites et l'observation que le transfert passif d'immunoglobulines de personnes immunes diminue la parasitémie ainsi que l'immunisation efficace et stérilisante par des sporozoïtes atténuerés par irradiation ont rendu raisonnable

l'argument d'un vaccin contre le paludisme, dont le développement constitue alors une priorité de santé publique au niveau mondial.

1.3 A la recherche de l'immunité salvatrice

5 L'immunité naturelle contre le paludisme est caractérisée par un développement très lent et le fait qu'elle n'aboutit pas à une protection stérilisante. Dans les zones hyperendémiques, l'acquisition de l'immunité naturelle contre les stades érythrocytaires se manifeste chez les enfants d'abord par une tolérance au parasite (immunité anti-toxique) puis avec l'âge par une
10 diminution de la charge parasitaire dans le sang (immunité anti-parasitaire).

Ces observations, faites au cours des études épidémiologiques ont été confirmées par des infections expérimentales. La malarariothérapie appliquée aux personnes atteintes de neurosyphilis (Boyd and Coggshall, 1938; Ciuca et al., 1943; James, 1936), a permis de définir des paramètres qui interviennent
15 dans l'acquisition de l'immunité dans des expériences étroitement contrôlées. Il a ainsi été montré que l'immunité acquise était d'une part dépendante de l'espèce et de la souche et d'autre part différait en fonction du stade du cycle parasitaire infectant. Jusqu'à présent, les mécanismes précis de l'immunité anti-paludéenne restent à élucider.

20 Du fait que les signes cliniques et la transmission sont uniquement dus aux stades sanguins et que ceux-ci sont les plus accessibles aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la plupart des études vaccinales ont concerné ces stades. Une trentaine d'antigènes exprimés dans les parasites érythrocytaires ont été identifiés, particulièrement par des anticorps monoclonaux et considérés en tant
25 que candidats vaccins. Toutefois les essais d'induction d'immunité protectrice par les rares antigènes testés chez l'homme sont demeurés infructueux jusqu'à présent.

La première immunisation avec les stades pré-érythrocytaires a été tentée sans succès par les frères Sergent en Algérie (Sergent and Sergent, 1910). La
30 capacité de protéger de façon stérilisante (absence de toute parasitémie sanguine) n'a été obtenue que par l'immunisation avec des sporozoïts atténus par irradiation. Cette approche fut initiée par des études chez l'oiseau avec des

sporozoïtes irradiés par des rayons U.V. (Mulligan et al., 1941), et a été reprise 20 ans plus tard avec des plasmodies de rongeur en utilisant des sporozoïtes irradiés par des rayons X et plus tard des rayons γ , dont la dose peut être contrôlée plus facilement (Nussenzweig et al., 1967; Richards, 1966) ; l'immunité 5 peut être maintenue par un rappel de sporozoïtes non-atténués (Orjih et al., 1982). Chez l'homme, une telle protection a aussi été obtenue (Clyde, 1975; McCarthy and Clyde, 1977), toutefois elle n'est induite qu'après un très grand nombre d'inoculations par des sporozoïtes irradiés si bien qu'une telle procédure vaccinale ne peut être appliquée à grande échelle.

10 Pendant longtemps, on a cru que la protection était corrélée avec un phénomène observé lorsque l'on incube les sporozoïtes avec du sérum immun, la CS (Circum sporozoïte) précipitation (Vanderberg et al., 1969). La protéine majoritaire reconnue par ce sérum, la protéine CS, a donc été considérée responsable de cette immunité. Depuis elle a été à l'origine de multiples études 15 vaccinales dans beaucoup de modèles expérimentaux. Or jusqu'à présent aucune de ces études n'a pu reproduire une immunité aussi solide que celle induite par des sporozoïtes irradiés.

Une évaluation critique des résultats expérimentaux précédents a mené à postuler que c'était le stade hépatique et non le sporozoïte qui était à l'origine de 20 immunité stérilisante (Druilhe and Marchand, 1989). L'indice principal était le fait que la protection ne pouvait être induite que par l'inoculation des sporozoïtes viables, par voie intraveineuse, capables d'envahir un hépatocyte et de s'y développer, et que les formes hépatiques issues de sporozoïtes irradiés persistaient (Ramsey et al., 1982). De plus, une élimination des stades 25 hépatiques provoquait une susceptibilité aux infections par des sporozoïtes chez des animaux préalablement protégés (Londono et al., 1991; Scheller and Azad, 1995).

Le stade hépatique possède des caractéristiques uniques. L'hépatocyte est une cellule nucléée métaboliquement très active et exprime des molécules du 30 complexe majeur d'histocompatibilité. La schizogonie hépatique entraîne la formation d'entre 10.000 et 30.000 merozoïtes alors que 4 à 32 merozoïtes sont libérés par un schizonte sanguin. Les merozoïtes issus de ces deux stades ont

des différences morphologiques, mais on ne sait pas s'il existe des différences fonctionnelles ou moléculaires, car seuls les merozoïtes sanguins ont pu être extensivement étudiés.

Du fait que dans le foie, seuls quelques hépatocytes sont infectés et qu'*in vitro*, les techniques de culture restent délicates et difficiles, ceci a constitué un obstacle majeur au développement des connaissances sur le stade hépatique et à la recherche d'antigènes exprimés à ce stade.

1.4 Criblage d'antigènes spécifiques de stade

La première stratégie pour établir l'expression spécifique de stade est la génération de banques d'ADN complémentaires à partir d'ARN messagers des différents stades. Ceci a été accompli plusieurs fois aux stades sanguins (Chakrabarti et al., 1994; Watanabe et al., 2001) et plus récemment une fois au stade sporozoïte (Fidock et al., 2000). Cependant, cette approche n'est pas possible pour le stade hépatique des plasmodies humains. Un autre moyen est la génération d'anticorps spécifiques dans des modèles animaux. Ceci est facile aux stades érythrocytaires mais pour le stade hépatique, plusieurs tentatives ont échoués, car les injections de stades hépatiques de *P. falciparum* n'ont induit que très peu d'anticorps dans les souris. Une dernière approche est le criblage immunologique basé sur l'utilisation d'anticorps d'individus naturellement immunisés. Cette approche a permis de mettre en évidence pour la première fois que d'autres antigènes que la CS étaient présents à la surface du sporozoïte (Galey et al., 1990).

1.5 Stratégie élaborée dans le laboratoire d'identification d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires

Afin de contourner la difficulté de criblage aux stades pré-érythrocytaires, une stratégie de criblage d'antigènes de *P. falciparum* potentiellement exprimés dans les stades sporozoïte et hépatique a été développée (Marchand and Druilhe, 1990).

Le principe était de chercher des individus chez lesquels la réponse immunitaire prédominante était contre les stades pré-érythrocytaires. Nous avons

- ainsi obtenu des sérums d'individus (sérums PM) vivant en zone d'endémie depuis plus de 20 ans et n'ayant jamais eu d'accès cliniques car ils étaient en permanence sous traitement prophylactique à la chloroquine (schizonticide efficace contre les stades sanguins, mais sans effet sur les stades hépatiques).
- 5 Les sérums correspondants ne reconnaissaient en effet que très faiblement des stades sanguins en Western Blot et en IFI (titres inférieurs à 1/200), tandis que les titres contre les stades sporozoïtes et hépatiques du parasite étaient compris entre 1/3200 et 1/6400 en IFI et ils marquaient plusieurs polypeptides sur des extraits protéiques de sporozoïtes de *P. falciparum*; il s'agissait donc de sérums
- 10 contenant des anticorps spécifiques des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires.

Ces sérums ont été utilisés pour cibler une banque génomique de *P. falciparum* (construite par Odile Mercereau Pujalon). L'ADN génomique issu du clone parasitaire T9-96 a été méthylé et digéré par la Dnase 1, et les fragments 15 d'une taille allant de 200 à 2500 paires de bases ont été introduits dans le site EcoR1 du phage λgt11 (Guérin-Marchand et al., 1987).

Parmi les 7 millions de fragments d'ADN générés, 2000 clones produisant un antigène recombinant reconnu par des sérums hyper immuns (SHI) d'individus immuns vivant en zone d'endémie, ont ensuite été ciblés avec les 20 sérums PM. 120 clones ont ainsi été sélectionnés et l'expression de stade des antigènes correspondants a été déterminée par des tests d'IFIs, avec des anticorps humains immunopurifiés sur chaque protéine recombinante, sur les sporozoïtes, les stades hépatiques et les stades sanguins de *P. falciparum*, *P. yoelii* et parfois avec *P. berghei* et *P. vivax*.

25 Le premier antigène à être étudié et contre lequel les réponses humorales étaient les plus élevées dans plusieurs sérums d'individus vivant dans une zone d'endémie était le Liver Stage Antigen 1, LSA-1 (Guérin-Marchand et al., 1987). Il demeure le seul antigène caractérisé à être exprimé uniquement au stade hépatique.

30 A la suite du LSA-1, 3 antigènes STARP, SALS, et LSA-3 ont été sélectionnés à partir de divers critères et caractérisés au niveau moléculaire (Bottius et al., 1996; Daubersies et al., 2000; Fidock et al., 1994), et

immunologiquement par L. Benmohammed , K. Brahimi, J.P. Sauzet et B. Perlaza. (BenMohamed et al., 1997; Perlaza et al., 1998; Sauzet et al., 2001). Ces antigènes sont exprimés aussi bien à la surface du sporozoïte qu'au stade hépatique.

5 Le LSA3 est l'unique antigène reconnu différentiellement par des sérums de volontaires ou de chimpanzés protégés par l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés. Il est le seul à avoir induit une protection stérilisante et de longue durée chez des chimpanzés (Daubersies et al., 2000), et sera bientôt testé dans des essais cliniques de phase I et II.

10

2) MATERIEL ET METHODES

2.1. Techniques de biologie moléculaire

2.1.1. Souches bactériennes

DH5 α : supE44 Δ lacU169(ϕ 80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1.

15

2.1.2. Souches de parasites:

NF54 issue d'un isolat de malade européen infecté en Afrique (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

20 3D7, la souche référence utilisée dans le projet génome, est un clone issu de la souche (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

T9.96, une souche provenant d'un patient thaïlandais ATCC : MRA153 , (Thaithong et al., 1984)

25 Pour les tests de polymorphisme, des souches distinctes ont été employées: B1 (Brésil); F32, D7, D28, D50 issues de la Tanzanie; D28 du Sénégal, D41 de l'Inde, D51 de Myanmar, L1 de Libéria, H1 de Honduras, Mad20 de Papua New Guinea, et PA de Palo Alto, d'Amérique du Sud Ouest. (Stricker et al., 2000).

Les sporozoïtes sont issues de la souche NF54 et obtenus par passage dans des *Anopheles Gambiae* REF

30

2.1.3. PCR à partir d'extraits de phages ou d'ADN de phages

Le Expand High Fidelity Kit™ (Mannheim Boehringer, Allemagne) a été utilisé comme indiqué par le fournisseur avec 2 mM de MgCl₂, 3.5 unités de Taq polymérase, 0.2 mM de desoxyribonucléotides (dNTP), 50 nM des amores 21D en 5' (CCTGGAGCCCGTCAGTATCGGC GG; SEQ ID NO : 13) et 26D en 3' (GGTAGCGACCGGGCGCTCAGCTGG; SEQ ID NO : 14) et 2 µl d'ADN purifié ou d'extrait de phage. La réaction a comporté une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C, suivie par 35 cycles consécutifs de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 50 °C, et 2 minutes d'elongation à 68 °C. Le circuit cyclique a été suivi par une incubation à 68 °C pendant 5 minutes.

2.1.3.1 Sous-clonage dans les vecteurs histidine, pNAK et Topo

Selon la qualité du produit d'amplification des phages, trois procédures ont été employées:

15 Les produits PCR présentant un smear ou un rendement très petit et étant de plus petite taille quasi impossible à détecter en digérant l'ADN du phage correspondant, ont été clonés par l'intermédiaire d'un vecteur permettant un clonage direct du produit PCR sans digestion successive d'une enzyme de restriction à l'aide du kit de TopoTA Cloning™ (Invitrogen, Les Pays-Bas). Le 20 clonage Topo a aussi été effectué pour les fragments dont nous voulions uniquement déterminer la séquence.

Les produits PCR de tailles inférieures à 1 Kbp ont été digérés, précipités à l'éthanol, et resuspendus dans la moitié du volume initial d'H₂O, puis digérés par 10 U de l'enzyme de restriction EcoR1, pendant 1 heure à 37 °C, tirés sur un 25 gel d'agarose à 2 %, purifiés sur gel par la procédure de gel extraction kit de Qiagen, donnant un volume de 50 µl.

Les produits PCR peu abondants de grande taille (supérieurs à 1000 bp) ont été isolés à partir de l'ADN de phage purifié par une digestion avec EcoR1, puis par extraction de l'insert du gel d'agarose.

2.1.3.2 Étude du polymorphisme du gène dans des souches parasitaires différentes.

Les amores suivantes ont été utilisées pour identifier les polymorphismes en taille de régions spécifiques correspondant aux antigènes étudiés.

- 5 747-1: AAAAGTGATGATAGAAATGCTTGTG (5') ; SEQ ID NO : 15
 747-2: TTTTGTTGATCTTACTTATTCACC (3') ; SEQ ID NO : 16
 772-1: CGGAATCAGGTTAAATCCAAC (5') ; SEQ ID NO : 17
 772-2: AGATCGTTTCATCAGGGGG (3') ; SEQ ID NO : 18.

10 La réaction cyclique a été effectuée avec un programme comportant une étape initiale d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, suivie par 39 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, une hybridation à 52 °C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une étape de 5 minutes à 72°C a terminé la réaction.

15 Les PCR ont été effectuées sur un Crocodile III™ de Appligène. Les produits ont ensuite été analysés sur gel d'agarose.

2.1.4. Purification d'ADN

2.1.4.1 Pour les analyses de recombinants

20 Les colonies positives en PCR ont été inoculées dans 3 ml de milieu contenant l'antibiotique correspondant au vecteur utilisé (100 µg/ml ampicilline pour Topo et Histidine, 20 µg/ml kanamycine pour le vecteur Vical) et 2 ml d'inoculum ont été utilisés dans la préparation d'ADN plasmidique avec le Qiagen™ Miniprep Kit. L'ADN obtenu a successivement été digéré avec les enzymes de restriction utilisées dans le clonage et soumis à une électrophorèse 25 sur gel d'agarose, afin de détecter l'insertion du fragment.

2.1.4.2 Pour l'isolement de fragments:

30 100 ml de milieu Luria Broth supplémenté en antibiotique approprié ont été inoculés avec 1 colonie de bactérie comportant le recombinant, et incubé à 37 °C sur la nuit dans un bain thermostaté en agitation vigoureuse. Le lendemain, la culture bactérienne a été récoltée et l'ADN plasmidique purifié comme décrit (Qiagen maxiprep™, Qiagen, Allemagne).

2.1.4.3 Pour l'immunisation de constructions ADN nu

Afin d'éliminer les endotoxines, qui sont présents dans les bactéries et qui peuvent entraîner des réponses non spécifiques lors des immunisations de 5 souris, l'ADN des constructions a été purifié à partir de 2 l de culture de bactéries recombinantes, par Qiagen EndoFree Plasmid Giga™ kit (Qiagen, Allemagne).

2.1.4.4 Pour la purification d'ADN de phages recombinants

Les phages ont été réamplifiés sur des boîtes d'agarose de LB, en 10 déposant 5 µl sur du Topagar pris avec 200 µl d'inoculum de Y1090, et en laissant à 37 °C sur la nuit.

Ensuite, une quantité plus grande a été produite en culture liquide. D'abord, une plage piquée sur la boîte a été incubée avec 200 µl d'inoculum de 15 Y1090, laissée à 37 °C avec agitation pendant 15 minutes . Ensuite, 5 ml de milieu sans antibiotique supplémenté avec 10 mM de MgSO₄ a été ajouté, et la culture laissée en agitation pendant 4 heures, jusqu'à l'apparition de lyse. 50 µl de Chloroforme a été ajouté, et le tout centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant libéré des débris cellulaires a été récupéré. Ce stock a été utilisé dans la production de 500 ml de phage en culture liquide : 20 l'équivalent de 7.5 10⁸ pfu (unités formant des plaques) a été ajouté à 500 µl de cellules d'une culture inoculée sur la nuit de Y1090, et 500 µl de 10 mM MgCl₂/CaCl₂. Tout a été incubé à 37 °C 15 minutes, et ajouté à 500 ml de milieu LB sans antibiotique. La lyse des bactéries observée par l'apparition de filaments dans la culture a été suivie jusqu'à la lyse totale (4-5h). Ensuite, la culture a été 25 centrifugée à 6000 g pendant 15 minutes à 4 °C, le surnageant récupéré, et stocké à 4 °C sur la nuit.

Le lendemain, la purification de l'ADN a été entreprise avec le Lambda Maxi Kit™ (Qiagen, Allemagne) avec des ajustements en début de protocole à cause du volume plus grand de surnageant de départ. Le culot final a été 30 resuspendu dans 500 µl de tampon TE.

2.1.4.5 À partir de parasites

100 µl de culot de culture de globules rouges à 10 % de parasitémie, a été resuspendu dans 100 µl de PBS, pH 7,2 et purifié par le Qiaamp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Allemagne). A partir de 100 µl de culot d'une culture parasitée à 10 %, 5 on a obtenu environ 5 µg d'ADN.

2.1.5. Purification d'ARN total parasitaire

Nous avons utilisé deux méthodes en fonction de la quantité d'ARN voulu. Pour des quantités importantes, la méthode décrite par (Kyes et al., 2000) a été 10 employée, tandis que pour obtenir des préparations de quantités plus restreintes, nous avons utilisé le RNeasy kit™ (Qiagen, Allemagne.)

2.1.6. RT-PCR.

La RT-PCR a été effectuée avec le kit RT-PCR de Qiagen (Allemagne). 15 Des amores spécifiques pour chaque gène et situées, si possible, de telle façon que l'on puisse distinguer entre les produits issus d'amplification d'ADN génomique et d'ARN (autour des introns) ont été utilisées. Une première réaction de Transcription réverse a été effectuée à 50 °C pendant 30 minutes, puis une réaction de PCR a été effectuée, dans les même conditions que celle décrites 20 pour une PCR d'ADN de parasite avec les amores sélectionnées, parfois suivi d'une deuxième réaction (nested PCR) avec des amores situés dans la séquence du premier produit PCR amplifié. Cependant, la température d'hybridation varie en fonction des amores utilisées (entre 50 et 60 °C).

25 2.1.7. Purification des recombinants histidine

2 l de milieu de Luria Broth additionné avec l'ampicilline à 100 ng/ml a été inoculé avec 50 ml de culture de bactérie contenant le plasmide recombinant. La croissance des bactéries a été suivie par la mesure de la turbidité bactérienne à 600 nm et à la densité optique voulue (entre 0,5 et 1) une concentration d'IPTG 30 variant entre 0,5 et 1 mM selon le recombinant a été ajoutée à la culture, et l'induction a duré entre 2 h et 4 h.

Ensuite les cellules ont été récoltées et le culot de bactéries resuspendu dans un tampon de 20 mM de NaPO₄, pH 7.4, et 8 M d'urée (TU) (25 ml/litre de culture bactérienne). Ensuite, la suspension de cellules a été soumise à des sonifications de 10 chocs de 1 minute chacun, et le surnageant contenant les protéines recombinantes a été récupéré par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes, et filtré à 0.22 µm. Ensuite, une étape de purification par affinité sur une colonne de Nickel a été effectuée. Une colonne de 1 ml (HiTrap™, Pharmacia, Suède) a été lavée comme indiqué par le fournisseur et 1 ml de NiCl₂ a été appliqué, suivi par d'autres lavages. Ensuite, la colonne a été lavée avec 5 ml de TU, et le surnageant appliqué sur la colonne. Ensuite, un lavage de 10 ml de TU a été effectué, et le recombinant élué par un gradient croissant en imidazole, compétiteur de l'histidine. Selon le recombinant purifié, des concentrations différentes ont été employées, et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ensuite, le pool de protéines a été dialysé contre un tampon L-histidine pH 6, et chromatographié sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q™, Pharmacia, Suède) afin d'éliminer une partie des Lipo Poly Saccharides (LPS) ou endoxines qui induisent des réponses non spécifiques (Morrison and Ryan, 1987).

20

Tableau de purification des recombinants histidine

Recombinant	Induction ¹			DO après induction	Emplacement de la protéine, Poids moléculaire ²	Imidazole (mM) ³	NaCl (mM) ⁴
	DO	IPTG	Temps				
747	0.5	0.5	4h	2.7	Mem, 18	50	360
772	0.5	0.5	4h	2.2	SN, 35	36	120

1 : La DO mesurée à 600 nm, La concentration en IPTG (mM) ; et le temps d'induction avant récolte.

25 2 : Après sonication, et centrifugation d'une suspension de bactéries ne contenant pas d'urée (8M) dans le tampon, le surnageant et le culot contenant les débris de membranes bactériennes ont été testés en Western blot afin de détecter où la protéine recombinante se trouvait. En présence d'urée toutes les protéines étaient solubles, et les procédures de purification ont donc été appliquées en présence de 8 M d'urée.

30 3 : La concentration d'imidazole à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Ni™
4 : La concentration de NaCl à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Q™

2.2. Techniques immunologiques

2.2.1. ELISAs (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay)

Les conditions optimales ont été déterminées avec 100 µl de solution d'antigène d'une concentration de 10, 5 ou 1 µg/ml coatés sur les plaques dans

- 5 50 mM de Carbonate pH 9.6 ou 1X PBS pH 7.4 en incubant les plaques sur la nuit à 4 °C. La saturation a été effectuée, soit en PBS supplémenté par 3 % de lait écrémé, ou 1% de BSA (albumine de sérum de veau) à température ambiante ou à 37°C pendant 2 heures. La dilution de sérums de 100 ou de 200 fois a été effectuée soit avec du PBS/lait à 1.5 % , soit avec du PBS/BSA 1%, et
10 l'incubation a été faite à température ambiante ou à 37°C pendant 1 h.

L'incubation avec les anticorps secondaires couplés à la HRPO (peroxidase de navet) dilués au 1/2000 dans le tampon de dilution des sérums a été effectuée à température ambiante, et les révélations ont été faites à l'aide des tampons de TMB (peroxidase substrate et peroxidase solution B) (Laboratories

- 15 Kirkegaard et Perry, USA) mélangés volume à volume immédiatement avant utilisation dont 100 µl ont été distribués dans chaque puit. Les réactions colorées en bleu ont été arrêtées en ajoutant le même volume d'une solution d'1 M d'acide phosphorique. Les réactions sont lues à 450 nm dans un lecteur Multiscan Ascent™ (Labsystems).

- 20 Les résultats des souris sont exprimés en Ratio (unité arbitraire par rapport aux taux des réponses dans des témoins naïfs) et dans les expériences où les taux des isotypes ont été étudiés, par rapport au Ratio des IgG totaux déterminé dans la même expérience.

2.2.2. Immunopurification d'anticorps spécifiques

- Pour l'immunopurification d'anticorps spécifiques contre les recombinants His₆, une méthode décrite par (Brahimi et al., 1993) a été employée. 100 µl/puits de solution d'antigène dans du PBS, pH 7.2, à une concentration de 5 µg/ml ont été adsorbés sur plaques Nunc Maxisorp™ (Nunc, Danemark), et les plaques
30 incubées à +4 °C la nuit. Ensuite, des s'rum hyperimmuns ont été incubés à une dilution de 1/50 pendant 1 heure à température ambiante, les plaques lavé s et l'élution des anticorps effectuée par ajout de glycine pH 2.5 à 0.2 M, incubation

pendant 3 minutes et récupération suivie par une neutralisation du pH avec du Tris, 1M, pH 11. L'immunopurification à partir de recombinants de fusion β -galactosidase a été effectuée sur des filtres de nitrocellulose, comme décrit (Beall and Mitchell, 1986).

5

2.2.3. SDS-PAGE et Western Blot

En fonction des échantillons à tester, des gels de pourcentage d'acrylamide (BioRad™ 29:1:1 ratio) variables (5, 7.5, 10 ou 12 %) ont été utilisés. Après migration en tampon Tris/glycine (pH 8.5) avec le kit minigel 10 (Biorad, USA) les gels ont soit été colorés par bleu de Coomassie soit soumis à un transfert sur filtres de nitrocellulose (0.45 μ m), dans la cellule Trans-Blot™ (BioRad.)

Après transfert, les protéines ont été visualisées par une coloration avec 0,2 % de rouge Ponceau dans une solution d'acide acétique (5%), puis le filtre a 15 été saturé en TBS/lait écrémé à 5 % pendant 30 minutes. Les anticorps humains immunopurifiés sans dilution, et les sérum dilués 1/100 ou 1/200 dans du TBS/lait 5% / Tween™ 0,05% ont été incubés pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Ensuite, le filtre a été lavé 3 fois 10 minutes en 20 TBS/Tween™ 0,05 %, et incubé avec les antisérum couplés à la phosphatase alcaline dilués 1/5000, pendant 30 minutes. Après lavage dans le même tampon, les réactions colorées ont été produites par l'ajout de NBT (330 μ g/ml) et de BCIP (165 μ g/ml) (Promega, Allemagne) dilués dans du tampon Tris pH 9.

2.2.4. IFI (Immunofluorescence indirecte)

Toutes les incubations à 37°C ont été effectuées dans une chambre humide afin d'éviter l'assèchement des tissus ou cellules à étudier. Les tampons ont été filtrés par un filtre à 0.22 μ m afin d'éviter des contaminations par d'autres microorganismes et des bruits de fond.

2.2.4.1 Stade sporozoïtes

Après dissection des glandes salivaires de moustiques infectés avec le parasite, les sporozoïtes ont été fixés avec 0.01 % de glutaraldehyde en PBS et lavés soigneusement en PBS.

5 Afin d'étudier le marquage uniquement en surface des sporozoïtes, (Galey et al., 1990) a développé une technique permettant une fixation « humide » avec une suspension de sporozoïtes attachés à la polylysine. Les lames de titration (PolyLabo, France) ont été coatées avec 1 µl d'une solution de 50 mg/ml de polylysine, puis laissées sécher une nuit à 37°C. 1 µl d'une suspension de 10 sporozoïtes (20/µl) a été déposée sur chaque puits, et incubé dans une chambre humide à 4°C sur la nuit. La détection d'une présence intra-parasitaire a été faite par fixation des sporozoïtes dans l'acétone.

2.2.4.2 Stade hépatique

15 Les coupes fixées au Carnoy et paraffinées ont été préparées par 3 bains de Xylène de 10 mn chacun, 3 bains d'alcool absolu de 5 mn chacun, 2 bains d'eau distillée de 5 mn chacun, et séchées à l'air libre. Ensuite, les coupes ont été réhydratées pendant 10 mn dans du PBS pH 7.4 filtré. Les coupes à congélation ont été fixées 10 minutes en acétone.

20

2.2.4.3 Stade sanguin.

Les frottis sanguins ont été fixés 10 minutes à l'acétone, et des cases pour chaque échantillon à tester ont été délimitées en dessinant des bords avec un marqueur Pentel-rouge sur le frottis.

25 La suite de la technique a été identique pour les trois stades: Après fixation, les anticorps à tester (dilués dans du PBS) ont été déposés sur chaque puit, coupe ou case, et la lame incubée à 37°C en chambre humide pendant 1 heure. Les lames ont été lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, puis incubées avec un anti-IgG anti-humain ou souris (selon les anticorps spécifiques utilisés), couplé à la fluorescéine (Alexis) dilué 1/200 dans du PBS et du bl u d'Evans 1/50000, incubées 30 minutes à 37°C en chambre humide, lavées trois fois en PBS 1X, et couvertes par une lamelle après qu'une goutte de tampon

glycériné (PBS 30 % glycérol) ait été déposée. La lecture de la lame a été effectuée au microscope à U.V (Olympus™ BH2))

2.2.5. *Immunisations de souris*

5 2.2.5.1 Par les recombinants histidines

Les protocoles a, b et c ont essentiellement été appliqués pour obtenir des sérums spécifiques, tandis que les protocoles b, c et d ont été employés afin d'effectuer des infections d'épreuve par *P. yoelii*.

10 a) Adjuvant IFA/Alum

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 1 première injection intra-péritonéale de 500 µl, avec 1 mélange de 20 µg d'antigène (His₆-249, His₆-680, His₆-747, His₆-772), 2 mg/ml d'Alum (Al(OH)₃, et de l'Adjuvant incomplet de Freund (AIF), volume dans volume, supplémenté avec 0.9% de NaCl.

15 Les 2 injections suivantes, chacune à 15 jours d'intervalle, ont été effectuées avec la même quantité d'antigène dans le même volume, mais sans AIF, et avec de la méthiolate, un conservateur, à 0.05%.

20 Les souris ont été prélevées (500 µl) avant l'immunisation 2 semaines, 1 mois et 6 semaines après la première immunisation, sur EDTA et les plasma récupérés et stockés à -20°C.

b) CFA

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 3 injections sous-cutanées tous les 15 jours à la base de la queue d'un mélange constitué par 25 100 µl d'adjuvant complet de Freund et de 10 µg d'antigène (His₆-114 ou His₆-662) dans 100 µl de PBS. 1 semaine après la troisième injection, les sérums des souris ont été prélevés et les réponses testés en ELISAs contre le recombinant et en IFI sur les sporozoïtes. 18 jours après la dernière injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

c) SBAS₂ (Adjuvant Smith and Klein Beecham)

Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué par 57 µl d'adjuvant mélangé avec 43 µl d'antigène (His₆-249, His₆-747 ou His₆-772)

5 correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérum correspondants récoltés.

d) Microparticules

10 Les solutions d'antigènes (His₆-249, His₆-747 ou His₆-772) ont été adsorbées sur des microparticules en polystyrène de 0.5 µm de diamètre (Polysciences Inc, USA) par incubation à 37 °C en agitation pendant 4 heures dans une solution de glycine, pH 8.0. L'adsorption de l'antigène a été vérifiée par la capacité des micro-billes d'agglutiner avec un sérum spécifique à l'antigène
15 adsorbé. Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué de microbilles coatés avec l'antigène correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérum correspondants récoltés.

20

2.2.5.2 Par les recombinants ADN

Des souris BALB/c et C3H de 6 semaines ont été injectées 3 fois à 8 semaines d'intervalle par voie intramusculaire avec 100 µl d'antigène (pNAK114, pNAK249, pNAK438, pNAK571, pNAK747, pNAK772) dans du PBS pH 7.4, puis
25 une 4ème fois 12 semaines après la 3ème injection. Les prélèvements de sang ont été effectués 1 semaine après la 3ème et la 4ème immunisation sur EDTA, et les sérum récoltés après une incubation du prélèvement la nuit à 4°C.

Les rates de 3 souris /groupe ont été prélevées après la 4ème immunisation, et les stimulations des réponses cellulaires étudiées. Après un
30 5ème boost, 8 semaines après la 4^{me} injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

2.2.6. Infection d'épreuves par sporozoïtes et par stade sanguin

Les sporozoïtes issus de moustiques *Anopheles stephensi* infectés par le clone 1.1 de *P. yoelii yoelii* ont été obtenus par une méthode (Ozaki et al., 1984) qui consiste en l'isolement de la cage thoracique du moustique et l'obtention par centrifugation à travers de la laine de verre des sporozoïtes, qui ont été lavés par des resuspensions successives en PBS après centrifugation.

Les souris ont été infectées par des sporozoïtes de *P. yoelii* par voie rétro orbitale avec 150 à 200 sporozoïtes (200 µl/ injection), et la parasitémie suivie par des frottis du jour 3 suivant l'infection jusqu'au 12ème jour post-infection, 10 aussi bien sur les animaux immunisés que sur des souris naïves infectées par le même lot de sporozoïtes.

Des stades sanguins prélevés sur d'autres souris infectées par *P. yoelii* ont été lavés dans du PBS, et l'équivalent de 5×10^4 parasites ont été injectés par voie intraperitoneale.

15

2.2.7. Étude des réponses cellulaires.

Afin d'étudier aussi bien l'induction de prolifération de cellules-T spécifiques ainsi que la sécrétion de cytokines capables de stimuler la réponse immune, nous avons étudié la stimulation de splénocytes de souris par les 20 antigènes et la sécrétion d'IFN-γ par ces cellules.

2.2.7.1 Proliférations de lymphocytes T

Les rates ont été prélevées sur les souris, les suspensions de splénocytes ont été lavées deux fois dans du RPMI 1640™ (Gibco, France) et les cellules 25 resuspendues à une concentration finale de 5×10^6 cellules /ml dans du RPMI supplémenté avec 100 U/ml pénicilline, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 50 µM β-mercaptopéthanol, 1,5% serum de veau foetal (SVF) et 0,5 % de serum de souris normal. 100 µl/puits de chaque suspension a été distribuée dans des plaques de 96 trous à fond rond (Costar, USA) et les protéines recombinantes à 30 tester ont été ajoutées à une concentration de 50 mg/ml. Ces tests ont été effectués en triplicat. Après 48 h d'incubation, (37 °C avec 5 % de CO₂), 50 µl/puits de surmargeant de culture a été prélevé et stocké à -70 °C avant la

détermination de titres d'IFN- γ . 50 μ l/puits de surnageant a été prélevé pour dosage de cytokines. Afin de détecter la réPLICATION d'ADN due à une stimulation de division, 50 μ l d'une solution de thymidine tritiée (3 H) (Amersham Life Science, England) à 1 μ Ci/puits a été ajoutée durant les 12 dernières heures d'incubation.

5 Les cellules ont été récoltées dans un récolteur de cellules automatique (Skatron Inc, Sterling, VA, USA), et l'incorporation de Thymidine 3 H quantifiée par scintillation. Les résultats sont exprimés en Index de Stimulation (I.S.) et la prolifération a été considérée comme positive, lorsque le S.I. est au dessus de 2.

10 2.2.7.2 Détection de sécrétion d'interféron γ (IFN- γ)

Les titres d'IFN- γ dans les surnageants de culture ont été déterminés par un méthode d'ELISA à double capture. Des plaques Maxisorp™ (Nunc, Danemark) à fond plat ont été coatées par un anticorps monoclonal de rat anti-IFN- γ de souris primaire (R4-6A2) (Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans un

15 tampon de 0.1 M de carbonate, pH 9.6, et laissé sur la nuit à 4 °C. Entre chaque étape de la procédure, les plaques ont été lavées plusieurs fois avec du tampon PBS supplémenté avec 0,05 % Tween™ (PBS-T). Ensuite, les plaques ont été saturées avec 3% d'albumine de serum de veau (BSA, Sigma Chemicals, St Louis, USA) dans du PBS-T. Des surnageants non-dilués ont été ajoutés aux
20 puits et les plaques incubées sur la nuit à 4°C, suivi par une incubation 1 h à température ambiante avec un anticorps monoclonal rat anti-souris IFN- γ secondaire biotinylé (XMG1.2™, Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans du PBS-T. Les étapes de marquage avec des anticorps couplés à la peroxidase sont identiques à celles utilisées dans la technique de l'ELISA. (A.2.1)

25

2.2.7.3 Détection de cellules sécrétrices d'IFN- γ par Elispot

Le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- γ a été déterminé dans des splénocytes non stimulées 40 heures après qu'elles soient fraîchement isolées et incubés avec les antigènes. Des plaques de microtitrage (Multiscreen-HA™, plaque stérile, Millipore) ont été coatées par 50 μ l d'une solution contenant 5 μ g/ml d'anticorps anti-IFN- γ (18181D™, Becton Dickinson Co). Après une

incubation sur la nuit à 4 °C, les puits ont été lavés et saturés par une solution de 5 % de SVF. Des suspensions de cellules de 5×10^5 cellules/puit ont été incubées avec l'antigène à 50 µg/ml dans un volume total de 200 µl pendant 40 h, à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO₂. Les plaques ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS-T et 3 fois avec du PBS seul et les puits ont alors été coatés par 50µl de solution d'anticorps anti-souris IFN-γ biotinylé (Becton Dickinson Co, USA) dilué au 1/200 et incubé sur la nuit à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées de la même façon que précédemment, avant un ajout de 50 µl par puit de phosphatase alcaline couplée à la streptavidine (Boehringer-Mannheim, Allemagne) à une dilution de 1/2000 dans du PBS. Après 1 h d'incubation, et lavage des plaques, des spots ont été détectés par développement d'une réaction colorée avec les réactifs BCIP/NBT à 50 µg/ml à l'endroit où des cellules individuelles ont sécrété de l'IFN-γ. Les résultats sont exprimés comme le nombre de cellules formant des spots par rapport aux 5×10^6 splénocytes.

2.2.8. Sérums et cellules

2.2.8.1 D'individus naturellement exposés au parasite.

10 sérums provenant d'adultes vivant dans une forte zone d'endémie (Côte d'Ivoire) et naturellement protégés ont été employés dans des études d'ELISA et des immunopurifications d'anticorps spécifiques aux antigènes étudiés.

Des sérums provenant d'individus de deux tranches d'âges allant de 0 -9 ans ou au dessus de 12 ans, ont été sélectionnés des Villages Ndiop et Dielmo (Rogier and Trape, 1995; Trape et al., 1994). Ndiop est situé dans une zone d'endémie qui compte environ 20 piqûres infectieuses/an, et Dielmo, dans une zone qui compte 150 piqûres infectieuses/an. Chaque serum dans une des deux régions correspond en âge et en sexe à un serum de l'autre région.

30 2.2.8.2 D'animaux ou d'humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés.

Deux chimpanzés ont été immunisés soit avec des sporozoïtes irradiés à 18 kRad, soit à 30 kRad par 4 injections de 5×10^6 sporozoïtes chacune par voi

intravéneuse. Les 3 premières immunisations ont été effectuées avec 1 mois d'intervalle, tandis que la 4^{ème} a été effectuée 4 mois après la 3^{ème}. Leur sérum et les cellules du sang périphérique ont été étudiés dans des tests de réponses cellulaires et de réponses humorales après 3 immunisations. Les deux animaux
5 ont été infectés par l'injection intravéneuse de 4×10^4 sporozoïtes (faible dose) chacune de *P. falciparum* et seulement le chimpanzé immunisé avec les sporozoïtes irradiés à 18 kRad a été protégé (n'a pas développé de parasitémie sanguine).

Deux volontaires humains immunisés par le même moyen, ont reçu un
10 rappel avec un nouveau lot de sporozoïtes irradiés, et les cellules du sang périphérique ont été étudiées dans des tests d'Elispot. De plus, le sérum de 4 volontaires humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés a également été à la disposition de la Demanderesse.

15 **2.2.8.3 D'individus exposés différemment au parasite**

Nous avions à notre disposition des sérums de 8 individus exposés naturellement au parasite mais sous traitement de chloroquine permanent, ce qui élimine les stades sanguins à une forme très précoce et des sérums de 5 individus accidentellement infectés par la transfusion de sang infecté par
20 *P. falciparum*.

3) RESULTATS

3.0: Exemple 1

Identification de deux antigènes nouveaux DG47 et DG772 de *P. falciparum*
25 reconnus par des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradié

Les clones DG 747 et DG772 ont été sélectionnés non seulement à cause des critères initiaux posés (détectio sur les sporozoïtes et le stade hépatique, ainsi qu'une reconnaissance par des sérums hyperimmuns), mais parce que plusieurs caractéristiques supplémentaires nous ont intéressés : le DG747 n'avait
30 aucune réactivité croisée avec d'autres protéines de la banque PM, et le DG772 n'avait qu'une seule réactivité croisée, avec LSA1, le seul antigène identifié

comme exprimé uniquement au stade hépatique de *P. falciparum*. De plus, des anticorps spécifiques des deux protéines marquaient des sporozoïtes de *P. yoelii*.

Un séquençage initial a révélé que ces deux clones contenaient des inserts appartenant à des gènes jusqu'ici inconnus, mais dont la séquence était 5 disponible sur les bases de données du génome de *P. falciparum*. Nous nous sommes donc consacrés au travail de la caractérisation moléculaire d'expression du stade, de la conservation du gène, ainsi qu'à un travail de caractérisation immunologique (antigénicité, immunogénicité) de ces nouveaux antigènes. Les résultats ont montré que a) ces deux antigènes induisent une réponse immune 10 chez des individus ou des animaux uniquement exposés aux stades pré-érythrocytaires aussi bien artificiellement (par immunisation) que naturellement (sur le terrain), b) qu'ils sont reconnus par des sérums d'individus naturellement exposés au cycle entier du parasite, aussi bien dans des zones de faible que de forte endémie. De plus, nous avons évalué chez la souris leur potentiel 15 immunogène et protecteur par l'immunisation et l'infection d'épreuve par *P. yoelii*.

3.1. Analyse des séquences

DG747 code pour un polypeptide de 59 acides aminés dont les 40 acides aminés (aa) C-terminaux font partie d'une structure répétitive de 5 x 8 aa riches 20 en arginine et en lysine. Cette séquence est identique aux aa 81-140 du gène PfB0155c (1524 pb, 508 aa) situé sur le chromosome 2 (Figure 3.1a). Ce gène qui code pour une protéine putative (Gardner et al., 1999), ne comporte ni introns, ni peptide signal prédicts, ni de régions homologues à d'autres protéines 25 qu'elles soient de *Plasmodium* ou d'autres organismes. La protéine correspondante a une masse moléculaire théorique de 59 kDa, et un point isoélectrique neutre (7.5), mais certaines régions ont des pl très variables, par exemple la région retrouvée dans DG747 a une charge positive à pH neutre.

DG772 contient un insert de 333 pb, qui sont traduits en 111 aa contenus dans un cadre de lecture ouvert. Ce polypeptide correspond à la région des aa 30 1146-1256 d'une protéine de 1493 acides aminés codée par un gène situé sur le chromosome 1 (figure 3.1b). La masse théorique de la protéin est de 173 kDa et le point isoélectrique est de 5.05. La protéine est constituée n majorité d'acides

aminés polaires et ne contient pas de sites hydrophobes, à part dans la partie N-terminale, où il pourrait y avoir un site d'ancrage de GPI. Le gène ne contient pas de répétitions et la séquence nucléotidique traduite a une forte homologie avec les protéines de la famille « EBP » (Adams et al., 1992), c'est-à-dire avec des 5 régions 5'cys et 3'cys qui sont caractéristiques de cette famille.

3.2. Expression de stade et conservation du gène

Afin d'évaluer plus précisément l'expression de stade des deux protéines, nous avons utilisé les techniques d'IFI et de Western blot sur des stades 10 différents de *P. falciparum* et sur les parasites murins *P. yoelii* et *P. berghei*.

La surface des sporozoïtes de *P. falciparum* a été marquée par les anticorps (humains ou de souris) spécifiques de DG747 et de DG772, mais les stades érythrocytaires ont été marqués d'une façon différente pour les deux groupes d'anticorps. Les anticorps anti-His₆-747 (anti-747) marquent peu les 15 stades jeunes, mais fortement les stades schizontes mûrs, avec un marquage localisé autour des structures knob (Figure 3.2 image A), tandis que les anticorps anti-His₆-772 (anti-772) marquent le parasite d'une façon plus homogène tout au long du stade érythrocytaire. Dans les espèces murines *P. yoelii* et *P. berghei*, la surface des sporozoïtes a été fortement marquée par les anticorps spécifiques 20 des deux antigènes.

Afin de définir les tailles des protéines détectées, nous avons aussi effectué un Western Blot des extraits protéiques de parasites sanguins de *P. falciparum* avec les mêmes anticorps (Figures 3.3 a et b).

Les anticorps anti-747 marquent un polypeptide d'environ 70 kDa aussi bien dans 25 les extraits d'anneaux que ceux de schizontes, tandis qu'aucune bande n'a été détectée dans les érythrocytes non parasités. Le polypeptide détecté par des anticorps anti-772 est plus grand, d'une masse moléculaire de 150 kDa, et est détecté aussi bien dans les anneaux que dans les schizontes. Le marquage d'extraits protéiques de *P. yoelii* a détecté un polypeptide de 70 kDa pour les 30 anti-747 dans les sporozoïtes et les stades sanguins et un polypeptide de 60 kDa pour les anti-772, seulement détecté dans les sporozoïtes de *P. yoelii*.

De plus, afin de confirmer la présence des protéines et leur constance d'expression à la surface des sporozoïtes provenant de plusieurs parasites différents, nous avons examiné par IFI des lots de sporozoïtes provenant de différents isolats Thai de *P. falciparum*. Le sérum anti-772 a marqué tous les 5 sporozoïtes, tandis que seulement 7 sur 10 des isolats testés étaient marqués par les anti-747. De même, des amplifications par PCR avec des amores spécifiques pour les deux fragments de gène (indiquées dans les Figure 3.1a et 3.1b) ont été effectuées avec de l'ADN issu de stades sanguins de 12 souches différentes de *P. falciparum* (Figure 3.4). Les produits PCR correspondant au 10 DG772 ont été amplifiés à partir des 12 échantillons et leur taille était similaire, tandis que les amores spécifiques pour DG747 n'ont pu amplifier un fragment qu'à partir de 9 des 12 ADN. Il faut préciser que toutes les lignées de parasites utilisées dans ce travail (T9-96, NF54 et 3D7) contiennent les gènes correspondants. Ces résultats indiquent une variation au niveau de l'expression 15 ou de la présence de DG747 dans des souches parasitaires, car au total, seulement 15 sur 22 parasites ont semblé contenir le gène du DG747 ou ont montré une réactivité positive en IFI.

3.3. Reconnaissance par le système immunitaire humain dans des zones 20 endémiques

En plus de l'étude de la constance d'expression de l'antigène, nous avons étudié la prévalence des réponses humorales d'individus vivant dans des zones de forte (Dielmo) ou de faible (Ndiop) endémie, et dans deux groupes d'âge différents dans ces deux zones (Figures 3.5a et 3.5b)

25 On observe une même prévalence (40 %) contre 747 dans la zone de faible endémie, sauf que le nombre d'individus qui répondent fortement (l'intensité de réponse par rapport aux témoins) augmente avec l'âge. Dans la zone de forte endémie, le nombre de répondreurs contre 747 augmentent avec l'âge, ainsi que l'intensité de la réponse, et la prévalence chez les adultes, que l'on peut considérer comme ayant acquis une immunité, est de 85 %. De plus, ces 30 réponses semblent corrélées avec l'exposition au sporozoïte, car le taux d'anticorps est plus élevé chez les individus d'un group d'âge donné dans une

zone de transmission plus forte. Toutefois, dans une même zone, la réponse n'a pas changé d'une façon significative durant des saisons de plus faible transmission (saison sèche) (résultats non montrés), ce qui pourrait correspondre à la réponse contre les stades sanguins et/ou indiquer que la réponse immune 5 anti-747 est de longue durée. La réponse induite par DG747 augmente en prévalence et en intensité en fonction de l'exposition et de la durée d'exposition au parasite (âge).

La réponse anti-772 augmente comme l'anti-747 en fonction de l'âge, mais avec une augmentation beaucoup moins importante, par rapport au taux de 10 transmission observé entre Ndiop et Dielmo et par rapport à l'âge. Le taux de réponses anti-772 mesuré en % de prévalence et en intensité est plus élevé pour les individus de bas âge que celui des réponses anti-747, mais moins forte (75%) que l'anti-747 (85%) à Dielmo dans les individus immuns.

15 **3.4. Comparaison des réponses induites par des stades différents du parasite**

Nous avions le privilège d'être en possession de cellules issues d'individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés, et de sérum provenant de personnes exposées de façon différente à l'infection parasitaire.

20

3.4.1. Réponses cellulaires

Toutes ces études ont été effectuées en étroite collaboration avec Jean-Pierre Sauzet dans le laboratoire. Compte tenu du peu de matériel dont nous disposons, nous avons restreint les analyses afin de détecter ce que nous avions 25 précédemment défini comme un des critères importants (rôle dans la protection) pour l'évaluation d'un potentiel vaccinal au stade pré-érythrocytaire. Nous avons étudié la sécrétion de IFN-γ de cellules issues de 2 individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, car nous avions observé, lors de l'analyse d'autres antigènes, et en particulier de LSA3, un candidat vaccin étudié dans 30 notre laboratoire (Daubersies et al., 2000), que le taux de sécrétion de cette cytokine semble être corrélé à la protection. Chez ces deux volontaires, le nombre de cellules sécrétant l'IFN-γ contre DG747 et DG772 est aussi élevé que

pour les recombinants issus de LSA3 (729 et PC), (Figure 3.6a). De plus, nous avons examiné si les réponses immunes cellulaires mesurées par la prolifération de lymphocytes T et la sécrétion d'IFN- γ différaient entre deux chimpanzés immunisés avec les sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, mais dont un n'était 5 pas protégé, (Figure 3.6b).

Les cellules du système immunitaire de l'animal immunisé avec les sporozoïtes irradiés viables (18 kRad) et ultérieurement protégé, ont reconnu les antigènes DG747 et DG772, ainsi que l'ont fait les cellules de l'animal immunisé avec des sporozoïtes irradiés non-viables (30 kRad), et pas protégé lors d'une 10 infection d'épreuve.

Les proliférations lymphocytaires sont à la limite de la valeur seuil, tandis que les taux de sécrétion d'IFN- γ sont élevés, aussi bien pour la quantité de cytokine détectée que pour le nombre de cellules sécrétrices (détecté par Elispot). Ceci est valable aussi bien pour les animaux efficacement immunisés et 15 ceux n'étant pas protégés. Cependant, il semble que les taux de réponses sont plus élevés pour les animaux immunisés avec les sporozoïtes irradiés de 30 kRad. Les réponses induites par 747 sont plus fortes que celles qu'induit 772, et les deux plus fortes que celles induites par LSA3.

Les cellules prélevées sur des animaux ayant subi une immunisation 20 supplémentaire par les sporozoïtes irradiés ont été endommagées lors du transport à partir du centre de primatologie en Afrique, et nous n'avons donc pas pu étudier la présence d'un « boost » induit contre ces antigènes.

3.4.2. Étude des réponses humorales

25 Nous n'étions pas en possession des cellules de tous les groupes humains exposés de façon différente à l'infection parasitaire, mais nous avons pu étudier en détail la réponse humorale (isotypes d'IgG) de volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (ISS, seulement exposés aux stades pré-érythrocytaires), d'individus naturellement immuns vivant en zone de forte endémie (exposés à 30 tous les stades du parasite), et d'un individu ayant été accidentellement infecté par le paludisme par transfusion sanguine, (uniquement exposé aux stades sanguins) (Figures 3.7a et 3.7b).

Pour les deux antigènes, la différence la plus grande est observée pour l'isotype cytophile IgG1 dont le taux est beaucoup plus élevé dans le sérum d'individus immuns (SHI) que dans le sérum issu du malade infecté par transfusion ou de volontaires ISS. Les réponses de ces deux derniers groupes 5 sont assez semblables et ne font pas apparaître de déséquilibre entre anticorps cytophiles (IgG1 et IgG3) et non cytophiles (IgG2 et IgG4). Nous avons en outre remarqué que le sérum issu d'un individu exposé longuement au parasite, mais sous prophylaxie permanente (le PM), a le même profil en isotypes que les ISS.

10 3.5. Immunogénicité chez la souris

Des souris de deux souches différentes ont été immunisées avec les recombinants sous formes de protéines, avec des adjuvants différents ou sous forme de constructions d'ADN « nu », sans adjuvant.

Une étude préliminaire avec une construction ADN nu ne comportant pas 15 de séquence signal permettant l'exportation de la protéine synthétisée a été effectuée. Les souris immunisées n'ont généré aucune réponse humorale, que cela soit pour ces deux antigènes ou pour d'autres étudiés simultanément. Cependant, nous avons détecté des réponses cellulaires spécifiques anti-747 et 20 anti-772. Aussi bien les proliférations de lymphocytes T que le taux de sécrétion d'IFN- γ ont été testés pour deux souches de souris, la C3H et la BALB/c. Les profils de réponses sont présentés dans les Tableaux 3.1a et 3.1b où l'on peut remarquer que pour le cas des réponses cellulaires de souris immunisées avec pNAK747, il y a aussi bien des stimulations de prolifération que de sécrétion 25 d'IFN- γ , tandis que pour pNAK772, les proliférations des cellules T ont été très peu stimulées par rapport à la stimulation de sécrétion d'IFN- γ qui est considérable. Parmi toutes les souris immunisées, le niveau le plus élevé de sécrétions d'IFN- γ est observé lorsque le niveau de stimulation de prolifération est le plus bas.

Les vaccinations par les autres formulations (protéine recombinante et 30 ADN nu avec une séquence signal) ont toutes induit une réponse humorale chez les souris (Figure 3.8). Tous les sérums issus de ces souris immunisées

reconnaissent la protéine native en tests d'IFI et le marquage correspond avec celui observé pour les anticorps humains immunopurifiés.

Les réponses anti-747 présentent un profil similaire pour toutes les souris immunisées et toutes les formulations utilisées, avec une réponse isotypique à prépondérance IgG2b. Les réponses anti-772 sont aussi similaires entre souris et formulations de vaccins, mais avec une nette prédominance des IgG1. Le profil isotypique dépend donc de l'immunogène plus que du mode de présentation utilisé. Cependant, les titres à point final sont beaucoup plus élevés lorsque l'on immunise avec des protéines recombinantes (1/200.000) par rapport à l'ADN (1/2000), et les titres des sérums de souris immunisées avec His₆-772 sont plus élevés que ceux des His₆-747.

Puisque nous avions observé une réactivité croisée avec le stade sporozoïte de *P. yoelii*, nous avons testé le potentiel protecteur de ces antigènes par l'infection avec des sporozoïtes de cette espèce de souris immunisées avec les protéines recombinantes. La parasitémie a été suivie par l'observation des formes sanguines sur des frottis à partir du jour 3 de l'infection et pendant 12 jours consécutifs. Nous n'avons observé aucune protection quelle que soit la souche de souris utilisée, car la parasitémie a été détectée au même jour que celle des souris non immunisées, et la courbe était semblable à celle des souris témoins (résultats non-montrés).

3.6 Données supplémentaires

3.6.1 DG772

Par RT-PCR sur l'ARN total issu de sporozoïtes et de parasites sanguins, les inventeurs ont pu déterminer les sites d'épissage de l'ARN messager correspondant au gène codant. La séquence des amorces a été extraite des données du génome de *Plasmodium falciparum*.

Les produits d'amplification sont de tailles identiques dans les stades sporozoïtes et les stades sanguins, et diffèrent de la taille du produit obtenu par amplification de l'ADN génomique et par séquençage les sites d'épissages se sont avérés d'être identiques (voir les introns indiqués dans la figure).

Le gène codant pour DG772 appartient à une famille de protéines identifiés par un motif partagé. Toutes les protéines de la famille des EBP (Erythrocyte Binding Proteins) partagent des motifs conservés de résidus cystéine dont l'agencement est similaire pour toutes les protéines. Cependant, le 5 degré d'identité ne dépasse pas 31 % (max. 57 % d'homologie), même dans les régions les plus conservées.

3.6.2 Tests d'immunogénicité envisagés dans les humains.

D'après nos résultats obtenus dans les souris, nous pouvons confirmer 10 que les antigènes DG747 et DG772 employés aussi bien sous forme d'ADN que sous forme de protéine recombinante sont immunogènes. De plus, du fait que les protéines recombinantes sont reconnues par des individus immunisés et protégés contre l'infection par des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* indique 15 un rôle de ces antigènes dans l'immunité pré-érythrocytaire. Un test dans des primates, et en particulier des chimpanzés permettra de choisir facilement la formulation optimale pour des tests cliniques chez l'humain.

Dans les essais de phase I, afin d'étudier l'immunogénicité et la sûreté du produit, nous envisageons trois formulations toutes préparées dans des conditions GMP: 1) l'antigène sous forme de protéine recombinante purifiée à 20 partir de la bactérie *Lactococcus lactis* (utilisation permise dans les humains) adjuvée avec l'adjuvant SBAS2 (GSK) ; 2) la construction d'ADN dans le vecteur Vical™ (Avantis Pasteur) ; et 3) des lipopeptides synthétiques injectés sans aucun adjuvant (v. LSA3) . Ces formulations vont être distribuées par injection sous-cutanée (au niveau du deltoïde). Par des tests préliminaires, nous savons 25 que les antigènes His₆-747 et His₆-772 induisent des réponses cellulaires et des réponses humorales chez des individus n'ayant été exposés uniquement aux stades pré-érythrocytaires. Nous allons ensuite étudier les réponses cellulaires et les comparant avec celles observées dans des individus immunisés avec des 30 sporozoïtes atténués par irradiation et protégés contre une infection d'épreuve avec des sporozoïtes non-atténués. En fonction de ces réponses, une infection d'épreuve avec des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* sera envisagée.

3.6.3 Homologie avec d'autres séquences nucléotidiques.

Une hybridation par Southern blot dans les conditions stringentes standard (0.1 X SSC, 60 °C) ne donnerait lieu à aucune autre hybridation qu'avec le gène 5 correspondant.

3.6.4 Recherche d'homologie par des moyens bioinformatique

Les recherches ont été effectuées avec le logiciel BLAST™ (tblastx et blastn) sur toutes les bases de données disponibles du génome de *Plasmodium* 10 *falciparum* ainsi que les bases de données d'autres organismes. Les paramètres utilisées sont les paramètres de défaut trouvées sur les site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

3.7 Discussion

15 Ce travail qui fait partie de l'étude des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires nous a permis une première caractérisation et l'évaluation du potentiel vaccinal de deux nouveaux antigènes de *P. falciparum*. Ces deux antigènes ont des caractéristiques différentes au niveau moléculaire. D'une part, la protéine dont fait partie le DG747 contient des répétitions, tandis que la 20 molécule contenant le DG772 n'a aucune répétition directe. Le gène Pfb0155c codant pour DG747 est petit (1524 bp) et contient une région répétitive à laquelle appartient DG747. Nous n'avons pas pu détecter la présence du gène par PCR dans toutes les souches, ni pu observer une réactivité avec toutes les souches de sporozoïtes étudiées. L'absence observée peut être due à une réelle délétion 25 du gène ou aux procédures expérimentales. En effet, une des amores utilisées pour la détection de la partie codante pour DG747 chevauche la partie répétitive, ce qui peut entraîner une difficulté à amplifier un gène contenant une répétition plus grande, ou à détecter un gène contenant moins de répétitions. De plus, ceci est aussi le cas pour la détection en immunofluorescence indirecte où un nombre 30 éventuel de variations de répétitions peut changer l'affinité des anticorps spécifiques, si l'epitope cible ch vauche cette région. L'expression détectée par IFI semble être présente tout au long du cycle parasitaire asexué dans l'hôte

vertébré (nous n'avons pas analysé les stades sexués). Malgré la présence de répétitions dans le DG747, nous n'avons pas détecté de réactivité croisée avec d'autres antigènes de *P. falciparum*. La séquence du gène entier n'a pas d'homologie avec d'autres protéines plasmodiales jusqu'ici identifiées, et nous 5 n'avons pas encore d'indications sur une fonction biologique éventuelle.

Le DG772 ne contient pas de répétitions et sa présence semble être constante, qu'elle soit détectée par PCR ou par IFI. Au niveau biologique, le gène codant pour DG772 s'avère être intéressant. Nous avons trouvé par homologie de séquence que ce gène de 5300 bp de cadre de lecture ouverte fait partie de la 10 famille des EBP (Erythrocyte Binding Protein) (Adams et al., 1992), mais que la séquence de DG772 n'appartient pas aux régions conservées de cette famille, il ne partage qu'une petite partie de séquences avec l'extrémité N-terminale de la région 3'cys. D'ailleurs, il n'a pas de réactivités croisées ni d'homologie de séquence avec DG249, un autre clone faisant partie d'une des parties consensus 15 du gène codant pour EBA-175. Il se peut que DG772 fasse partie d'une région qui confère une particularité à chaque molécule de cette famille. La présence de deux molécules de la famille d'EBP (EBA-175 et 772) sur les sporozoïtes pourrait impliquer qu'il existe plusieurs molécules de cette famille qui interviendraient de façon alternative dans le processus d'invasion comme décrit dans les stades 20 sanguins.

Une connaissance de la prévalence est utile lors de l'évaluation d'un candidat vaccin, et les prévalences obtenues pour DG747 et DG772, de 85% et 75%, sont importantes. Cette étude a montré l'antigénicité importante d'un petite 25 partie des deux molécules, et a suggéré qu'il y aurait un intérêt à étudier plus en détail d'autres epitopes de la même molécule. La réponse humorale détectée contre DG747 et DG772 dans des individus exposés en permanence indique qu'il y a une prépondérance en réponse IgG1 (type cytophilic) développée lors d'une exposition soutenue qui n'est pas retrouvée dans le cas de paludisme transfusionnel. Par contre, les profils de réponses humorales obtenus pour deux 30 groupes exposés aux stades pré-érythrocytaires à plus ou moins longue durée (PM et ISS) se ressemblent, et le niveau d'IgG1 est bas, ce qui indiqu que cet isotype traduit l'exposition répétée de l'antigène aux stades sanguins. L'étude

des réponses cellulaires dans ces mêmes zones devra être effectuée afin d'avoir une notion plus précise des réponses immunitaires induites par ces antigènes.

Aux stades pré-érythrocytaires, nous avons observé une induction de réponse cellulaire par ces antigènes aussi bien dans des chimpanzés que chez des humains. Nous avons observé la sécrétion IFN- γ , décrit comme un facteur intervenant dans la protection contre les stades pré-érythrocytaires. La différence de réponse observée chez les chimpanzés en fonction de la dose d'irradiation pourrait signifier que les antigènes sont reconnus aussi bien sur les sporozoïtes que dans les stades hépatiques. En effet, les sporozoïtes irradiés à 30 kRad sont incapables de pénétrer dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc seulement dues à cette exposition, tandis que les sporozoïtes irradiés à 18 kRad se développent dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc dues à ce stade. Il serait intéressant d'étudier de plus près les réponses induites dans ces deux animaux (restriction MHC1), et l'induction de « boost » de réponse lors de plusieurs immunisations successives. Ce travail a aussi montré que dans ces deux fragments d'antigènes, il existe aussi bien des épitopes T que des épitopes B.

L'immunogénicité induite par les deux antigènes dans la souris est différente avec une prédominance d'IgG1 pour le DG772, qui n'est pas observée pour DG747. Par contre, nous n'avons observé aucune différence dans les réponses en fonction des formulations, ce qui est intéressant car la présentation des molécules n'est pas identique pour chaque formulation. Les réponses cellulaires uniquement obtenues pour la formulation n'ayant pas induit de réponses humorales détectables montre qu'il y a eu aussi bien des proliférations de lymphocytes, que des sécrétions d'IFN- γ en fonction des souris.

Tableau D1: Récapitulatif des antigènes pré-érythrocytaires du paludisme connus à présent*.

Antigène	Références ¹	Stades d'expression ²					Localisation ³	Structur e
		S	H	SSA	SSS	Intron		
CS	(Nardin et al., 1982)	+	j	-	-		CHR3	+
LSA1	(Guérin-Marchand et al., 1987)	+	j,m	-	-		CHR4	-
TRAP	(Robson et al., 1988)	+	j,m	m	-		CHR13	-
PfHsp70	(Renia et al., 1990)	+	j,m	j,m	-		CHR13	
STARP	(Fidock et al., 1994)	+	j,m	-	-		CHR12	+
EXP-1	(Koenen et al., 1984), (Sanchez et al., 1994)	-	m	j,m	Nt		CHR12	-
Pfs16	(Bruce et al., 1990)	+	nt	-	+		?	-
SALSA	(Bottius et al., 1996)	+	j,m	-	-		CHR2	+
LSA3	(Daubersies et al., 2000)	+	j,m	-	-		CHR2	+
PfEMP3	(Pasloske et al., 1993), (Grüner et al., 2001)	+	j,m	j,m	-		CHR2	+
GLURP	(Borre et al., 1991)	+	m	j,m	Nt		CHR10	-
EBA-175	(Camus and Hadley, 1985)	+	j,m	j,m	-		CHR4,13 ?	+
DG747		+	j,m	j,m	-		CHR2	?
DG772		+	j,m	j,m	-		CHR1	+

* Les antigènes en gris sont les antigènes caractérisés dans cette demande.

5 NT : Non testé

1 : La présence aux stades pré-érythrocytaires d'autres antigènes (MSP-1) a aussi été suggérée, mais les résultats préliminaires restent à confirmer. Les références soulignées indiquent l'année de découverte de l'expression pré-érythrocytaire.

2. S : sporozoïte ; H : Stade hépatique jeune et mûr ; SSA : Stade Sanguin asexué jeune et mûr ;

10 SSS : Stade sanguin sexué. 3. ST : sub-télomérique. Les caractères en gras indiquent la forme du stade où le marquage est le plus intense.

3. La plupart des localisations chromosomales a été faites par recherche d'homologie sur des bases de données

Tableau 3.1a: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion d'IFN- γ par His₆-747 après 3 immunisations avec pNAK747.

Souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His ₆ -747	pGEX- NN	His ₆ -747	pGEX- NN
C3H	8.6 ± 3.0	3.2 ± 1.1	7.0 ± 0.4	4.0 ± 0
C3H	23.6 ± 5.9	8.8 ± 2.9	7.0 ± 0.7	4.0 ± 0
C3H	3.0 ± 0.9	1.1 ± 0.1	16.0 ± 1.9	1.0 ± 2
Positifs	2/3	-	1/3	-
BALB/c	2.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	40.0 ± 5.0	24.0 ± 3
BALB/c	23.6 ± 4.3	3.0 ± 0.3	15.0 ± 4.4	8.0 ± 1
BALB/c	33.7 ± 7.2	5.9 ± 0.3	16.0 ± 1.5	10.0 ± 4
Positifs	2/3	-	3/3	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His₆-747.

Les résultats positifs sont en gras.

5

Tableau 3.1b: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion d'IFN- γ par His₆-772 après 3 immunisations avec pNAK772.

Souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His ₆ -772	pGEX- NN	His ₆ -772	pGEX- NN
C3H	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	23.9 ± 2.0	10.7 ± 2
C3H	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.7 ± 2.0	3.3 ± 2
C3H	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	6.6 ± 0.1	5.8 ± 2.6
Positifs	0/3	-	1/3	-
BALB/c	3.5 ± 0.3	2.7 ± 0.4	24.0 ± 2.2	10.8 ± 3
BALB/c	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	31.3 ± 7.1	5.6 ± 0.5
BALB/c	3.2 ± 0.9	1.5 ± 0.2	25.0 ± 12.1	6.9 ± 1.5
Positifs	1/3	-	3/3	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His₆-772.

Les résultats positifs sont en gras

10

Tableau 4.1: Répons s cellulaires de souris après 5 immunisations av c pNAK438*.

souris	Prolifération (I.S.)	Sécrétion d'IFN- γ	Anticorps
C3H	2.3 ± 0.3	2.2 ± 2.0	-
C3H	1.8 ± 1.1	15.6 ± 4.0	-
C3H	3.2 ± 1.3	0.5 ± 0.2	-
Positifs	2/3	1/3	
BALB/c	4.3 ± 1.6	26.2 ± 6.3	-
BALB/c	5.3 ± 0.6	29.3 ± 8.5	-
BALB/c	15.3 ± 2.2	12.7 ± 8.7	-
Positifs	3/3	3/3	

* Les taux de réponses sont représentés par rapport aux réponses obtenues par une valeur seuil.

La valeur seuil est calculée en faisant la moyenne des réponses d'animaux non-immunisés et

5 celle des animaux immunisés contre un antigène non-relevant, comme l'OspC, une protéine de la *Borrelia burgdorferi*.

Tableau 4.2: Détection d'expression par IFI avec des anticorps humains immunopurifiés ou des sérum s de souris spécifiques anti-His₆-680

Parasites*	a-His ₆ -680 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

* Les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* viennent de la souche NF54.

T23: souche de prov nance thaï; NF54 souche d'origin africaine.

Tableau 5.1: Réactivités croisées détectées en Western blots entre les membres de la famille Pf11-1

	P43	P263	P322	P453	P525	P563	P571
E43							
E263							
E322							
E453							
E525							
E563							
E571							
E676f							
E571							

+++++	Réaction forte
++	Réaction moyenne

E : anticorps immunopurifiés (élus) sur les protéines recombinantes correspondantes.

5 P : protéine recombinante.

Tableau 5.2: Réactivités croisées au niveau nucléotidique entre les clones de la famille Pf11-1*

clones PM	PCR571 (1)	sonde contrôle
43	+++	++
88	++	0
322	+++++	+++++
525	++++	+++++
563	++++	++++
571	+++++	+++++
676f	++++	++++
729E	+++	+++++
263	++++	NT
381	++	NT
453	+++	NT

10 * L'intensité du signal est symbolisé par des croix.

NT : non testé.

Tableau 5.3 : Homologies de séquences des clones étudiés par BLAST

Clone	Taille nucléotidique ¹ (bp)	Répétitions acides aminés	Homologie	Degré d'homologie avec 571 Nucléotides Protéines
			Nucléotides Protéines	
DG43	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, 100% (=88)	80%, 80%
DG88	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, 100% (=43)	Idem DG43
DG263-7	253	Non	<i>P. falciparum</i> Chr 12 95%, 60%	-
DG263-8	176	Non	<i>P. f.</i> CHR12 95%, 45% humain chr22 58%	-
DG322-1	<u>500</u>	-	-	-
DG322-2	2000	PeeVLEEVl	Pf11-1 86 %, 65%	79% -
DG381	<u>400</u>	PEkivEEVI	plastid tRNA 100%, CHR2 71%	-
DG453	<u>300</u>	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 2 88%, 83%	93%, 72%
DG525	<u>450</u>	PeleEVEvl	GLURP R2 98%, 100%	-
DG563	438	PIVEEvvEE	Pf11-1 Part 4 : 86%, Part 1 68%	75%, 56%,
DG571	<u>550</u>	PEEilEEiv	Pf11-1 Part 5 87 %, 55%	100 %, 100%
DG676f	2000	PvVEEvLEE	Pf11.1 Part 4 88 %, Part 5 75%	74%, 44%
DG729E	1.7	-	mal3P5 100%	-

1 : Taille estimée par rapport aux produits PCR obtenus, ou la taille précise lorsque le clone entier a été séquencé.

CHR : Chromosome; part : partie

Tableau 5.4: Réactivité en IFI testés avec des anticorps spécifiques aux His₆-571 et Vi571

Parasites	a-His ₆ -571, aVi571 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

Tableau 5.5: Réponses cellulaires des souris immunisées avec pNAK571

souche de souris	Prolifération lymphocytaire		Interféron gamma	
	Index de stimulation		IU/ml	
	571 pGEX	NNpGEX	571 pGEX	NNpGEX
C3H morte	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.05	31.0 ± 2.5	21.21 ± 10.6
C3H	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	30.2 ± 2.6	10.50 ± 2.03
C3H	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	16.8 ± 0.1	6.65 ± 2.8
Positifs	0/3	-	2/3	-
BALB/c	3.5 ± 0.3	2.7 ± 0.13	23.1 ± 0.9	10.36 ± 2.2
BALB/c	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.1	15.9 ± 2.1	8.63 ± 3.9
BALB/c (morte)	3.2 ± 0.9	1.5 ± 0.1	5.3 ± 1.3	1.06 ± 0.5
Positifs	2/3	-	3/3	-

NNpGEX : recombinant de fusion GST de LSA3 non relevant.

10 Bien que la présente invention ait été décrite par rapport aux réalisations concrètes et privilégiée, il apparaîtra toutefois évident aux personnes versées dans l'art ou la science en cause qu'il est possible d'introduire un certains nombres de variations et modifications sans déroger à la portée de l'invention décrite et revendiquée dans ce document.

REVENDICATIONS:

1. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique ayant au moins 60 %, préféablement au moins 80% et 5 plus préféablement au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO: 1 (DG747) ou la SEQ ID NO: 2 (DG772).
2. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 10 nucléotides consécutifs identiques à la SEQ ID NO: 1 ou la SEQ ID NO: 2.
3. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2.
4. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il est codé par un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 60%, préféablement au moins 80% et plus préféablement au moins 95% d'homologie 20 avec la SEQ ID NO: 3 (DG747) ou la SEQ ID NO: 4 (DG772).
6. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 acides aminés consécutifs identiques à l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 7, et la SEQ ID NO: 8.
7. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 40%, préféablement au moins 60%, plus préféablement au moins 80% et encore plus préféablement au moins 95% d'identité avec l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et la SEQ ID NO: 12.
8. Polypeptide recombinant ou chimérique caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 7.

9. Antigène isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il consiste en un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou en un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 8.

5

10. Conjugué antigénique constitué de polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et/ou de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8; et d'un support sur lequel lesdits polynucléotides/polypeptides sont adsorbés.

10

11. Conjugué selon la revendication 10 caractérisé en ce que le support est constitué de microsphères, de microparticules de billes de latex, de microparticules de polyphosphoglycans (PGLA) ou de microparticules de polystyrène.

15

12. Utilisation d'un conjugué selon la revendications 10 ou 11, pour l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.

20

13. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux reconnaissants spécifiquement au moins un des polynucléotides, polypeptides et/ou conjugués définis aux revendications 1 à 11.

25

14. Anticorps selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'ils sont humanisés.

15. Vecteur de clonage ou d'expression comprenant une séquence polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30

16. Un vecteur selon la revendication 15, dans lequel la dite séquence polynucléotidique est incorporé dans un site non essentiel à la réPLICATION dudit vecteur.

17. Un vecteur selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ledit vecteur est choisi dans le groupe constitué par les plasmides, les cosmides et les phages.

5

18. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.

19. Cellule *E.Coli* recombinante choisie parmi les cellules déposées à la
10 C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accession I-2671 et I-2672.

20. Composition immunogène compréhendant:

- au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; et
- un véhicule pharmaceutique acceptable.

15

21. Composition immunogène selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS₂ et l'adjuvant incomplet de Freund.

22. Composition immunogène selon la revendication 20 ou 21, caractérisée en la molécule polypeptidique est adsorbé sur des microparticules.

25

23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans laquelle ladite molécule polynucléotidique est sous forme d'ADN.

30 24. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

25. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention d'une réponse cellulaire et/ou humorale *in vivo* et/ou *in vitro*.

5

26. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 25, caractérisée en ce qu'elle permet la production d'interféron-γ par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés.

10

27. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention d'une réponse humorale IgG.

28. Composition immunogène selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse humorale de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

15

29. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 28, caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire, *in vivo* et *in vitro*, une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*.

20

30. Vaccin anti-palustre comprenant:

- au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; et
- un véhicule pharmaceutique acceptable.

25

31. Vaccin selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

30

32. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 13 ou 14, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.
- 5 33. Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS₂ et l'adjuvant incomplet de Freund.
- 10 34. Utilisation d'au moins un des éléments suivants: polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, conjugués selon la revendication 10 ou 11; anticorps selon la revendication 13 ou 14; pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.
- 15 35. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :
- 20 a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un anticorps selon la revendication 13 ou 14 afin de permettre la formation de complexes immuns; et
- 25 b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.
- 30 36. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :
- a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la

revendication 10 ou 11; afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins un desdits éléments et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et

- b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

5

37. Méthode selon la revendication 35 ou 36, caractérisée en ce qu'à l'étape a), le tissu et/ou le fluide biologique est de plus mis en contact avec au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1,TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.

10

38. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments suivants :

- a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; les polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, les conjugués selon la revendication 10 ou 11;
- b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des éléments définis en a); et
- c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur susceptible d'être reconnu par un second réactif marqué.

15

20 39. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments suivants :

25

- des anticorps selon la revendication 13 ou 14;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur susceptible d'être reconnu par un second réactif marqué.

30

62

40. Le kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme selon la revendication 38 ou 39, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins une molécule peptidique choisie dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

5

41. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme selon l'une quelconque des revendications 38 à 40, caractérisé en ce qu'il comprend également l'adjuvant SBAS2.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 novembre 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/092628 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/445

(81) États désignés (*national*) : AE. AG. AL. AM. AT. AU. AZ.
BA. BB. BG. BR. BY. BZ. CA. CH. CN. CO. CR. CU. CZ.
DE. DK. DM. DZ. EC. EE. ES. FI. GB. GD. GE. GH. GM.
HR. HU. ID. IL. IN. IS. JP. KE. KG. KP. KR. KZ. LC. LK.
LR. LS. LT. LU. LV. MA. MD. MG. MK. MN. MW. MX.
MZ. NO. NZ. OM. PH. PL. PT. RO. RU. SD. SE. SG. SI.
SK. SL. TJ. TM. TN. TR. TT. TZ. UA. UG. US. UZ. VN.
YU. ZA. ZM. ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/01637

(22) Date de dépôt international : 15 mai 2002 (15.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
2.345.206 16 mai 2001 (16.05.2001) CA
2.346.968 23 mai 2001 (23.05.2001) CA

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux,
F-75724 Paris Cedex 15 (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : DRUILHE,
Pierre [FR/FR]; 26, rue Lecourbe; F-75015 Paris (FR).
GRÜNER, Anne-Charlotte [DK/FR]; 142 rue Marcadet,
F-75018 Paris (FR).

(74) Mandataire : ERNEST GUTMANN-YVES PLASSER-AUD S.A.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

A2
WO 02/092628

(54) Title: PLASMODIUM FALCIPARUM ANTIGENS AND VACCINE AND DIAGNOSTIC USES THEREOF

(54) Titre : ANTIGENES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

(57) Abstract: The invention concerns novel *Plasmodium falciparum* antigens and their vaccine and diagnostic applications. More particularly, the invention concerns immunogenic polynucleotide and polypeptide molecules, compositions comprising them, and methods for diagnosis and vaccination of malaria.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme (malaria).